

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Modulation de l'expression génique de macrophages stimulés au LPS par des ligands et des PPAR

Duchateau, Audrey

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté de Sciences

**Modulation de l'expression génique de macrophages stimulés au LPS par des
ligands des PPAR**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Audrey Duchateau

Juin 2004

III. Errata - Objectifs

L'objectif de ce mémoire consiste en l'étude des effets potentiellement anti-inflammatoires des PPARs sur les monocytes THP-1 différenciés en macrophages et stimulés au LPS.

Dans le cadre de la validation de la DualChip Human General (EAT), Vanessa Suin (2003) avait montré la surexpression de plusieurs gènes en condition de stimulation au LPS par rapport à la situation contrôle.

Nous avons donc repris les gènes surexprimés en présence de LPS mis en évidence par Vanessa Suin (2003), puisqu'ils encodent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α), une protéine d'adhérence impliquée dans la diapédèse (ICAM-1), une enzyme antioxydante (SOD2), une protéine anticoagulante (THBD ou Thrombomoduline). Mais nous avons élargi cette liste en incluant des gènes encodant des protéines impliquées dans le recrutement et la transmigration leucocytaires (MCP-1, uPAR et Plau), des marqueurs pour la différenciation en macrophages (CD36, un récepteur scavenger pour les lipoprotéines modifiées), des marqueurs de l'inflammation (la cytokine IL-6 et l'enzyme inductible COX-2 ou Cyclooxygénase 2, à la base de la synthèse des prostaglandines) et des facteurs de croissance, produits par les monocytes activés par le LPS (IGFBP3).

Dans notre travail, nous allons dans un premier temps vérifier si la réponse inflammatoire LPS-dépendante est la même chez les THP-1 différenciés en macrophages, et ensuite voir si le système PPAR peut modifier les profils d'expression LPS-dépendant et donc exercer des effets anti-inflammatoires dans ce modèle. Les différences d'expression génique seront analysées par la méthode de PCR en temps réel. Nous avons choisi de travailler sur des macrophages plutôt que sur des monocytes, étant donné que les PPARs sont très peu exprimés chez ces derniers - en particulier le PPAR γ dans les monocytes - et apparaissent lors de l'étape de différenciation en macrophages.

Dans un second temps, nous avons saisi l'opportunité d'étendre notre étude par l'utilisation d'un damier à ADN.

L'Adipo-Athéro-chip mise au point au laboratoire par l'équipe du Dr. Thierry Arnould en collaboration avec l'équipe du Pr. Martine Raes dans le cadre du réseau PAI (Pôle d'Attraction Inter-universitaire), est un damier en modèle murin utilisé pour suivre les variations d'expression génique au cours de l'adipogenèse *in vitro* ou dans du tissu adipeux de souris double Knock-out (DKO) traitées ou non dans le contexte de l'athérosclérose. Le damier comporte 89 sondes de captures ciblant des gènes encodant des facteurs hormonaux ou de croissance, des cytokines, des facteurs de transcription, des récepteurs et des transporteurs membranaires, ... en relation avec le métabolisme lipidique et glucidique, la différenciation adipocytaire et l'inflammation. Certains de ces gènes semblaient donc des cibles bien choisies dans le cadre de ce travail.

De ce fait, un changement de modèle cellulaire a été nécessaire, et notre choix s'est porté sur la lignée cellulaire de macrophages murins connue sous le nom de J774.1.

Nous espérons avec ce travail apporter des informations supplémentaires quant au rôle potentiellement anti-inflammatoire des PPARs sur une réponse LPS-dépendante dans les modèles cellulaires de macrophages utilisés.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Modulation de l'expression génique de macrophages stimulés au LPS par des ligands de PPAR

DUCHATEAU Audrey

Résumé

Depuis quelques années, le rôle des PPARs dans le développement de l'athérosclérose a été bien documenté et décrit, mais il existe toujours une controverse quant à leur rôle protecteur ou pro-inflammatoire au sein des lésions. Il semble que leurs effets soient dépendants du contexte environnemental et du type cellulaire impliqués. Dans ce travail, nous avons voulu mettre en évidence un effet potentiellement anti-inflammatoire des PPARs au sein de macrophages stimulés avec du LPS, composant pro-inflammatoire de la paroi des bactéries Gram négatives. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets d'agonistes des PPARs (rosiglitazone, GW501516 et 15d-PGJ2) sur la réponse inflammatoire de macrophages humains THP-1 induite par le LPS, et ce par la technique de PCR en temps réel. Si nous voyons un effet typique du LPS dans la réponse des cellules (surexpression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1 β , le TNF α ou l'IL6, de la chémokine MCP-1 ou encore d'enzymes comme la COX-2 et la MnSOD2), l'effet des agonistes semble moins tranché. En effet, seuls les gènes encodant le MCP-1, l'IGFBP-3 et le TNF α voient leur expression transcriptionnelle diminuer en présence de la rosiglitazone. La rosiglitazone inhibe également l'activation du facteur de transcription AP-1. En ce qui concerne la 15d-PGJ2, les effets anti-inflammatoires observés sont plus tranchés, mais comme déjà rapporté dans la littérature, ils peuvent être indépendants de l'activation des PPARs.

Dans un second temps, nous avons étudié les profils d'expression génique de macrophages murins stimulés avec du LPS en présence ou non d'agonistes des PPARs, par l'utilisation d'un damier à ADN développé au sein du laboratoire (l'Adipo-Athéro-chip). Bien que les résultats soient préliminaires (seules deux hybridations indépendantes ont été réalisées), nous pensons que le damier représente un outil prometteur dans l'étude des effets modulateurs de la réponse inflammatoire des macrophages par les agonistes des PPARs. Il constitue également un outil de choix pour comparer au niveau de l'expression génique des cellules spumeuses et pré-adipocytaires qui accumulent toutes deux les lipides intracellulaires..

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur: M. RAES

Remerciements

Me voici déjà au terme de ces quatres années...

J'ai le plaisir d'adresser mes plus sincères remerciements aux personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce mémoire.

Avant toute chose, je tiens à remercier Martine Raes pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour toutes ces heures passées à relire et corriger ce travail.

Je tiens aussi à te remercier, Sofia, pour ta gentillesse, ta patience, ton écoute et tes encouragements dans mes moments de doute. Merci de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même lors des dernières étapes de la rédaction.

Les filles, sans qui je n'aurais jamais passé de si bon moments.

Merci à toi Vanes, pour nos longues soirées à discuter, à s'écouter, à s'entraider dans les moments difficiles.

Merci Hélène de m'avoir aidée et toujours soutenu dans les derniers jours et de m'avoir appris que garder son calme est la meilleure arme dans la vie. Merci Céline pour tes folles idées qui me surprendront toujours et bien sur Audrey pour nos folles discussions (au Bouffon !!!).

Merci à vous quatre pour votre amitié et pour votre soutien en toutes circonstances. Vous êtes les meilleures et que ça continue encore longtemps !!!

Je te remercie Papa pour ta présence, ton soutien et pour tous ces trajets que tu auras faits tant de fois durant ces quatre années :-)

Je tiens à remercier tout particulièrement Maman, toi qui malgré la distance aura été plus proche que jamais !!! Je te remercie pour la précieuse aide que tu m'as apportée et pour toutes nos longues discussions. A toi aussi Michel qui toujours aura cru en moi, merci de ta patience et de ta gentillesse sans limite.

Remerciements

And last but not least, je remercie Jean-phi et Audrey pour leurs précieux encouragements ainsi que leur aide logistique !!

Enfin je tiens à remercier tous ceux qui ont fait de ces quatre années un plaisir !! Les mémorants de l'URBC (sans oublier les autres unités !!!), toutes les personnes rencontrées au labo, SEP, Stéphanie, Cindy et JP, au cercle et tous ceux dont la rencontre fut un enrichissement.

Merci

Audrey

Liste des abréviations

ABCA-1	ATP Binding Cassette transporter A-1
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AF-2	Activation Function-2
AP-1	Activation Protein 1
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	American Type Cell Culture
ATF1/2	Activating transcription factor 1/2
ATR-1	Angiotensin II Type 1 Receptor

BSA Bovin Serum Albumin

C	Cystéine
CAM	Cell Adhesion Molecule
CC	Cystein-Cystein
CCR1	CC-chemokine Receptor 1
CCR2	CC-chemokine Receptor 2
CCR9/10	CC-chemokine Receptor 9/10
CD14	Cluster of Differentiation 14
Ct	Cycle treshold
CML	Cellules Musculaires Lisses
CTE	DBD Carboxy-Terminal Extension
CTL	Contrôle
CREB	cAMP Response Element Binding-protein
CXC	2 cystéines séparées par 1 acide aminé
CX3C	2 cystéines séparées par 3 acides aminés

DBD	DNA Binding Domain
dNTP	déoxy Nucléotide TriPhosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiotréitol

ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2
ET-1	Endothéline-1

Liste des abréviations

GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GW	GW501516
HDL	High Density Lipoprotein
8-S-HETE	8-S-Hydroxyeicosatetraenoic acid
ICAM-1	Intracellular Cell Adhesion Molecule-1
iCOX2	Inducible Cyclo-Oxygénase 2
IFN γ	Interferon γ
I κ B	Inhibitory κ B protein
IKK	I κ B kinase
IL-8	Interleukine-8
iNOS	Inducible Nitric Oxyde Synthase
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KDO	2-Keto-DeoxyOctonoic acid
LBP	Ligand Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LPA	Lisophosphatidic acid
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leukotriene B4
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
Mad CAM-1	Mucosal vascular addressin Cell Adhesion Molecule-1
MCP-1	Monocyte chemoattractant Protein 1
MCP-3	Monocyte chemoattractant Protein 3
MEC	Matrice Extra-Cellulaire

Liste des abréviations

MEKK1	Mitogen Activated Protein Kinase ERK Kinase Kinase 1
MKK3/6	Mitogen activated protein Kinase Kinase 3/6
MMP-9	Matrix Metalloprotease-9
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NLS	Nuclear Localisation Site
NSAIDs	Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs
ox-LDL	LDL oxydée
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGD2	prostaglandine D2
PGJ2	Prostaglandine J2
15d-PGJ2	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE	PPAR Response Element
RHD	Rel Homology Domain
Ro	Rosiglitazone
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcription
RXR	Retinoid X Receptor
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SOD	Superoxide Dismutase
SR-A	Scavenger Receptor A
SRB-1	Scavenger Receptor B-1
SRF	Serum Response Factor
SRE	Serum Response Element

Liste des abréviations

STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAK1	TGF β Associated Kinase 1
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAF6	TNF- α Receptor Associated Factor
TRE	TPA Response Element
TZD	Thiazolidinedione
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Table des matières

Introduction

I. Rôle des Monocytes-Macrophages dans l'athérosclérose.....	4
I A. Introduction	4
I B. Rôle des Monocytes	5
I C. Rôle des Macrophages	7
II. Mécanismes moléculaires de l'activation des monocytes-macrophages	8
II A. Modèle pro-inflammatoire : stimulation avec le LPS	8
1. Description du LPS	8
2. Voies de transduction du signal activées par le LPS	9
2.1. Le LPS et son récepteur le TLR4	9
2.2. Voies de signalisation activées par le LPS (figure I 8)	9
a. Les kinases en amont de NF- κ B	9
b. La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).....	10
2.3. Facteurs de transcription activés par le LPS.....	10
a. NF- κ B	10
b. AP-1	11
c. Elk-1-SRF	12
d. CREB/ ATF-1	12
2.4. Les gènes cibles activés par le LPS.....	12
II B. Modulation de l'inflammation : les PPARs.....	13
1. Structure	13
2. Localisation et distribution tissulaire des PPAR.....	14
3. Ligands des PPARs	14
3.1. Ligands Naturels des PPARs	14
3.2. Ligands Synthétiques des PPARs	15
4. Mécanismes d'action des PPAR	16
5. Rôle particulier des PPARs dans l'athérosclérose	16
5.1. PPARs et vasoconstriction.....	16
5.2. PPARs et équilibre anti-/ pro-thrombogène.....	16
5.3. PPARs et recrutement des leucocytes	17
5.4. PPARs et réponse inflammatoire	17
5.5. PPARs dans la formation des cellules spumeuses et dans le transport du cholestérol.....	18

Table des matières

5.6. Rôle des PPARs dans le développement de la chape fibreuse et dans la stabilité de la plaque athéromateuse.....	19
5.7. Rôle particulier des PPARs chez les monocytes-macrophages	19
III. Objectifs	19

Matériel et méthodes

I. Culture cellulaire des monocytes THP-1	20
Matériels	20
Méthode	20
II. Différenciation des cellules THP-1 en macrophages.....	21
Matériels	21
Méthode	21
III. Culture cellulaire de macrophages murins J774.1	21
Matériels	21
Méthode	21
IV. Stimulation des macrophages.....	22
Matériels	22
Méthode	22
V. Dosage colorimétrique de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-122	
Matériels	22
Méthodes.....	23
VI. Extraction d'ARN total	24
Matériels pour les 2 types d'extractions	24
Matériels pour l'extraction d'ARN total avec le kit « RiboPure™ ».....	24
Protocole RiboPure (selon les instructions du fabricant).....	24
Matériels pour l'extraction d'ARN total avec le kit « RNAgents »	24
Protocole RNAgents (selon les instructions du fabricant).....	25
VII. Vérification de l'intégrité de l'ARN total	25
Matériel.....	25
Méthode (selon les instructions du fabricant)	26
VIII. Transcription inverse.....	26
Matériels pour les 2 types de RT.....	26
Matériels spécifiques pour une RT pour hybridation sur damier.....	26
Matériel spécifique pour une RT pour une PCR en temps réel.....	26
Méthode	27
IX. PCR en temps réel	27
Matériels	27
Méthode	28
X. Damiers à ADN	28
Matériels	29
Méthode	29

Table des matières

Résultats et discussion

<u>I. Effet de divers agonistes de PPAR sur l'expression génique induites par le LPS – Etude par PCR en temps réel.....</u>	30
I A. Mises aux points préliminaires	31
I B. Détermination des changements d'expression génique	32
1. Résultats	32
2. Discussion	36
<u>II. Effet de la rosiglitazone sur l'activation du facteur de transcription du facteur de transcription AP-1 par le LPS - Etude par test colorimétrique de binding</u>	39
II A. Résultats	39
II B. Discussion.....	39
<u>III. Etude de la rosiglitazone sur l'expression génique induite par le LPS – Etude par damier à ADN en modèle murin</u>	40
III A. Présentation du damier à ADN utilisé : l' Adipo-Athéro-chip	40
III B. Extraction des ARN totaux.....	41
III C. Hybridation et révélation sur damiers	42
III D. Résultats obtenus avec le damier à ADN	43
III E. Discussion des résultats obtenus avec le damier à ADN.....	45

Conclusions et Perspectives

Bibliographie

Annexes

Introduction

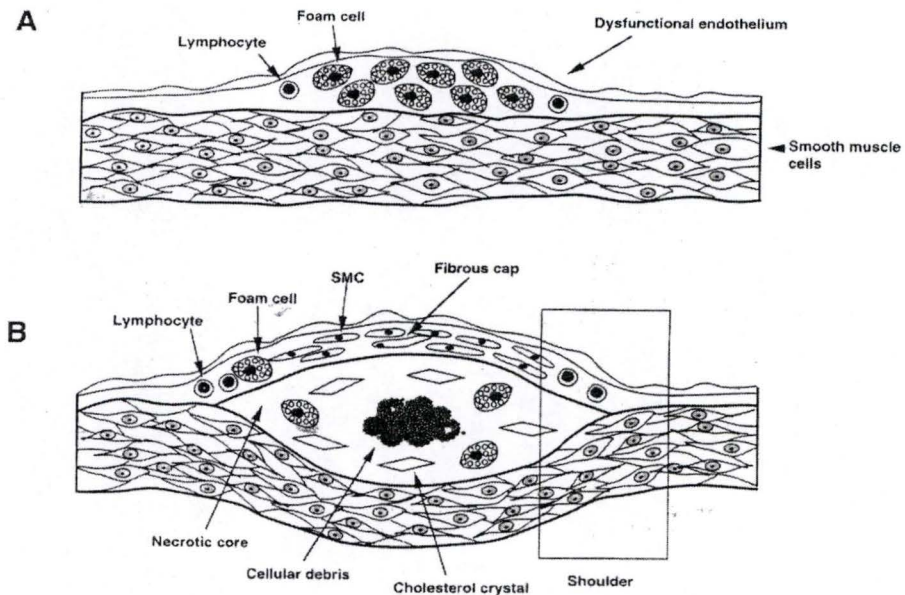


Figure I 1 : Schéma représentatif de la lésion athérosclérotique. A : La strie lipidique se caractérise par l'accumulation de cellules spumeuses dans la subendothéliale.

B : Architecture d'une plaque fibreuse où l'on retrouve les cristaux de cholestérol, les débris cellulaires, les cellules spumeuses et le coeur nécrotique (Collins et *al.*, 1996)

I. Rôle des Monocytes-Macrophages dans l'athérosclérose

I A. Introduction

L'athérosclérose, maladie cardiovasculaire responsable d'environ 50 % des décès aux Etats-Unis, en Europe et au Japon (Ross, 1993), est de nos jours la principale cause des accidents cardiovasculaires et cérébraux vasculaires, des attaques cardiaques, de la gangrène au niveau des extrémités des membres et des complications comme les ruptures d'anévrisme, entre autres. Cette pathologie est un cas particulier de l'artériosclérose, terme générique désignant un épaississement de l'intima artérielle, un amincissement fibreux de la média, entraînant un durcissement des artères, ainsi qu'une perte de l'élasticité des parois artérielles. Contrairement à l'artériosclérose qui touche aussi les artères de petit calibre et les artérioles, l'athérosclérose, qui est une maladie dégénérative du tissu conjonctif, n'atteint que les artères de grand et moyen calibre (aorte, artères coronaire et cérébrale et artères des membres supérieurs et inférieurs).

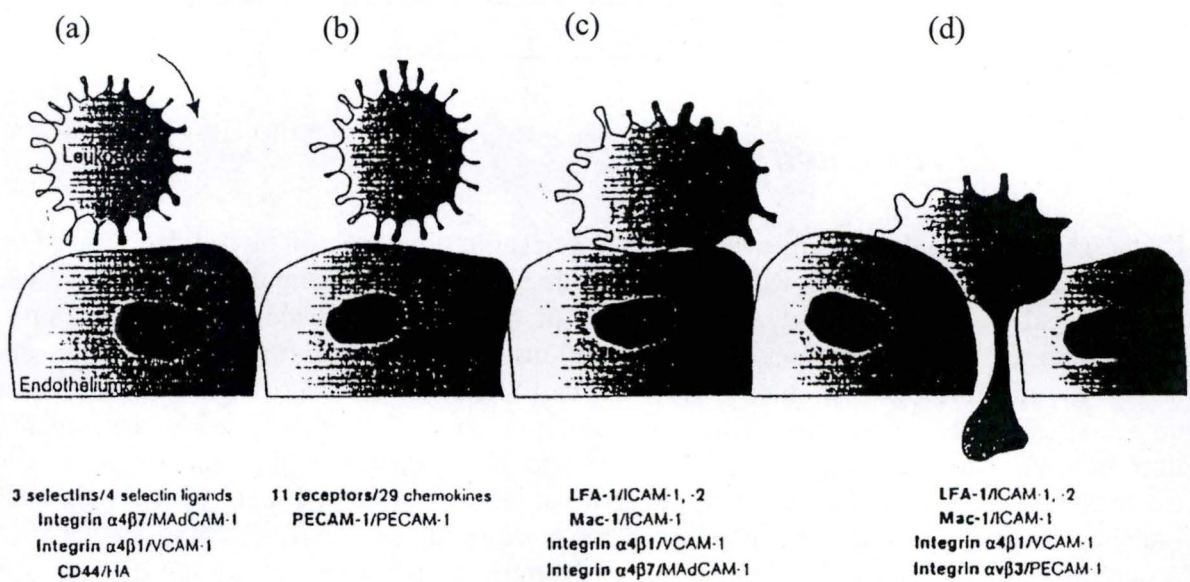
Trois composants cellulaires de la circulation, - les monocytes, les plaquettes et les lymphocytes T avec deux composants cellulaires des parois artérielles - les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses - interagissent de concert avec les lipoprotéines de faible densité (LDL) pour générer des lésions athérosclérotiques (Osterud *et al.*, 2003).

Les LDL (Low Density Lipoprotein) sont des lipoprotéines véhiculant le cholestérol endogène du foie vers les différents tissus via le sang. Une fois oxydées dans la paroi des vaisseaux sanguins, les LDL oxydées (ox-LDL) exercent une multitude d'effets pro-athérogènes, en stimulant entre autres la production de molécules pro-inflammatoires par les cellules endothéliales. D'autre part, les ox-LDL sont internalisées par les macrophages via les récepteurs aux ox-LDL, ce qui entraîne la formation des cellules spumeuses. Les LDL oxydées peuvent aussi être reconnues par les cellules musculaires lisses (CML) et favoriser leur prolifération, donnant ainsi lieu à une croissance de macrophages et de CML dans la paroi des vaisseaux sanguins.

Les lipoprotéines oxydées, captées par les macrophages, agissent de plusieurs façons sur la formation des lésions. Elles interviennent dans la formation des cellules spumeuses et exercent un effet chimotactique positif sur les monocytes du sang périphérique, mais inhibent la mobilité des macrophages activés, favorisant ainsi l'afflux et la rétention de macrophages dans les lésions.

La formation d'une lésion athérosclérotique se déroule en trois étapes majeures selon l'hypothèse de Ross (1995) (Figure I 1) :

- la formation des *stries lipidiques* qui se caractérisent par une accumulation de macrophages riches en lipides et de lymphocytes T à l'intérieur de l'intima (Ross, 1993).
- l'apparition des *lésions intermédiaires (ou fibro-lipidiques)* suivant les stries lipidiques, qui sont composées de la superposition de macrophages, de lymphocytes T et de cellules musculaires lisses.



© 1996 Current Opinion in Cell Biology

Figure I 2 : Schéma représentant la diapédèse leucocytaire. Le passage des leucocytes du sang au tissu nécessite l'interaction avec l'endothélium vasculaire. Ce processus se déroule en quatre étapes: (a) « rolling » le long de l'endothélium vasculaire; (b) signaux de « triggering » qui activent les intégrines leucocytaires; (c) adhérence ferme à l'endothélium vasculaire; (d) migration transendothéliale. Chaque étape est contrôlée par différentes molécules d'adhérence renseignées au bas de la figure (Dunon et *al.*, 1996)

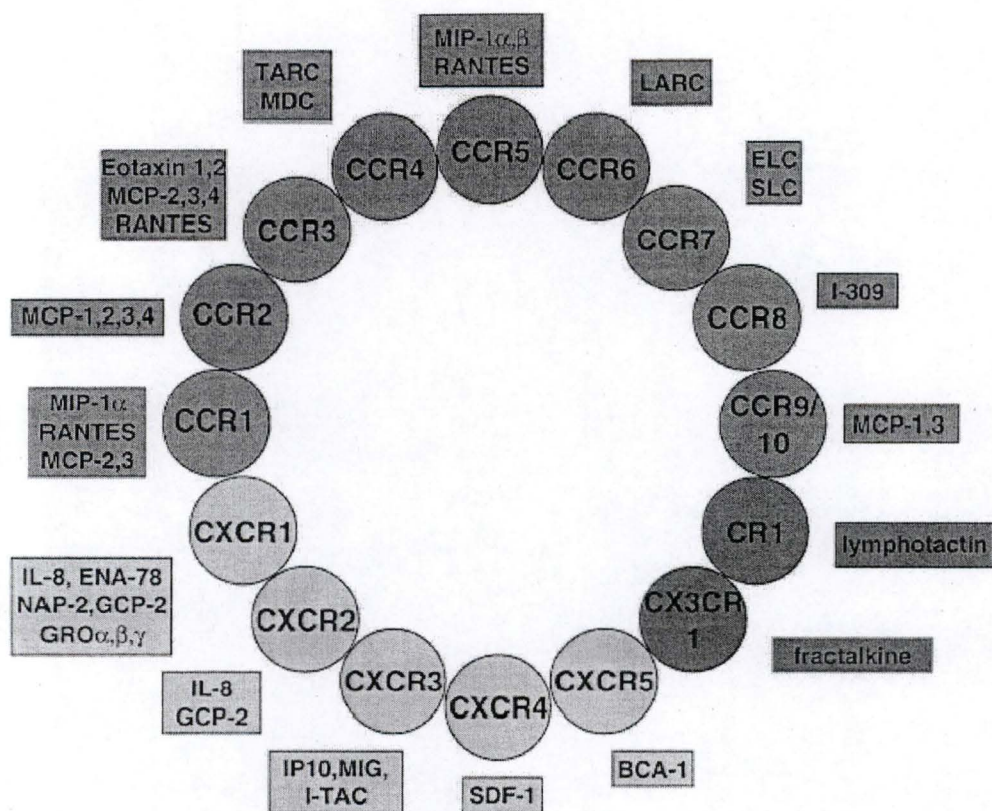


Figure I 3 : Diagramme représentant les différentes chémokines (représentées dans les rectangles) et leurs récepteurs (représentés par les ronds) (Reape *et al.*, 1999)

- la formation de la *plaque fibreuse*, dernière étape de la lésion avancée de l'athérosclérose. Elle est caractérisée par un dense capuchon de tissu conjonctif qui contient des cellules musculaires lisses, des macrophages, des lymphocytes, des cellules spumeuses et du tissu conjonctif dense. Le cœur nécrotique contient des débris cellulaires, des cristaux de cholestérol et des cellules spumeuses.

Les monocytes et les macrophages, qui nous intéressent dans le cadre de ce mémoire, jouent donc un rôle central dans les mécanismes précoces de l'athérogenèse. Nous allons décrire plus en détail ce rôle dans les paragraphes suivants.

I B. Rôle des Monocytes

Les monocytes jouent un rôle central dans de nombreuses conditions physio-pathologiques, particulièrement lorsque la progression de la maladie tend à augmenter les réactions inflammatoires, par exemple dans les maladies telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le psoriasis, l'asthme et les maladies infectieuses intestinales. Le potentiel pro-inflammatoire des monocytes est déclenché par la différenciation en macrophages, l'activation et donc la sécrétion des produits de l'activation, les cytokines pro-inflammatoires, produites aussi par les cellules endothéliales activées et les macrophages.

L'activation des monocytes passe tout d'abord par l'activation de l'endothélium : celui-ci, une fois activé par les mm-LDL (minimally oxydized LDL) va produire une série de molécules pro-inflammatoires, comprenant les molécules d'adhérence à la surface, des molécules chimiotactiques comme le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), et des facteurs de croissance comme le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Les monocytes, une fois activés par les molécules pro-inflammatoires produites par les cellules endothéliales, vont entamer le processus de migration à travers l'endothélium (Lusis, 2000).

Le recrutement des monocytes est un événement primordial dans l'athérogenèse. Cette étape se déroule en plusieurs phases (Figure I 2). Elle est régulée par les molécules d'adhérence cellulaire qui sont exprimées en surface des cellules endothéliales en réponse à des stimuli pro- inflammatoires.

La première phase du recrutement est **l'activation et l'attraction** des monocytes par les cellules endothéliales exprimant des molécules d'adhérence en surface. Cette première étape est assurée par des cytokines chimiotactiques (chimokines) sécrétées par les cellules endothéliales activées. Classées en fonction du nombre et de l'espace entre les cystéines de la région amino-terminale (Osterud *et al.*, 2003), les chimokines se divisent en plusieurs sous-classes (C : 1 cystéine, CC : 2 cystéines, CXC : 2 cystéines séparées par 1 acide aminé, CX3C : 2 cystéines séparées par 3 acides aminés). Il existe un récepteur respectivement pour les C et les CX3C-chimokines, 9 pour les CC-chimokines et 5 pour les CXC-chimokines (Figure I 3). Les différents récepteurs peuvent avoir plusieurs ligands et inversement, une chimokine peut être reconnue par plusieurs récepteurs. Le MCP-1 est la chimokine principale jouant un rôle dans l'attraction des monocytes dans l'athérosclérose (Osterud *et al.*,

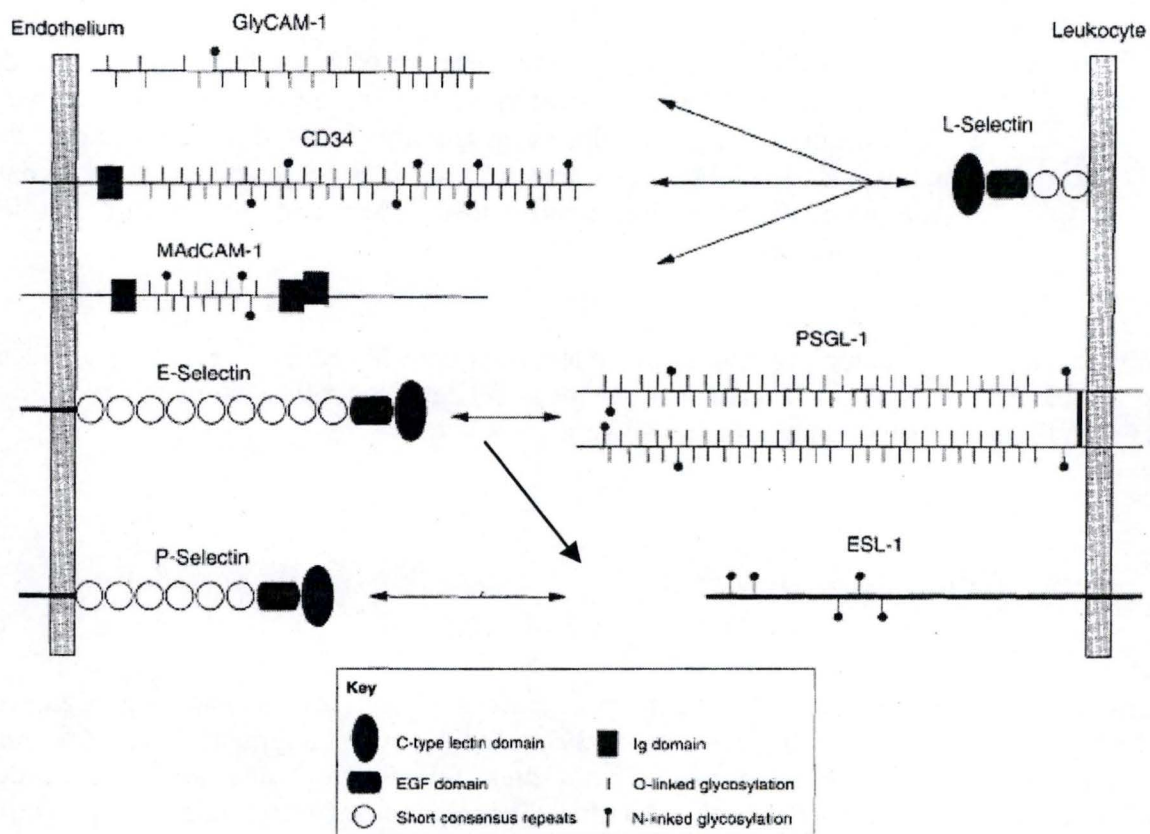


Figure I 4 : Schéma représentant les trois types de sélectines et leurs récepteurs correspondants.
 Les E- et P-sélectines sont situées en surface des cellules endothéliales et reconnaissent leurs ligands sur les leucocytes. La L-sélectine se trouve en surface des leucocytes et reconnaît des ligands sur les cellules endothéliales (Whelan, 1996)

2003). Elle fait partie de la sous-classe des CC-chémokines et son récepteur CCR2 reconnaît MCP-1, 2, 3 et 4.

Durant la seconde phase, nommée le « **rolling** », le monocyte roule sur l'endothélium et est ralenti par des interactions médiées par les sélectines : les L-sélectines, les P-sélectines et les E-sélectines. Les sélectines sont des molécules d'adhérence intercellulaires présentes sur deux types cellulaires. Les cellules endothéliales expriment les E- et les P-sélectines, alors que les leucocytes expriment les L-sélectines (Whelan, 1996).

La *L-sélectine*, exprimée de manière constitutive par les leucocytes, lie 3 ligands exprimés au niveau des cellules endothéliales : Mad Cam-1 (Mucosal-vascular-addressin Cell Adhesion Molecule-1), Gly Cam-1 (Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule) et la Sialomucine (ou CD34).

La *E-sélectine* reconnaît un motif Sialyl-Lewis X porté par une glycoprotéine monomérique des leucocytes : ESL-1 (E-selectin ligand). La E-sélectine est exprimée dans les cellules endothéliales activées.

La *P-sélectine* est stockée au niveau des corps de Weiber-Pallade lorsque la cellule endothéliale est au repos. Une fois la cellule activée, la P-sélectine est exprimée en surface cellulaire grâce à l'exocytose du corps de Weiber-Pallade. La P-sélectine est reconnue par un motif PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand 1) et peut aussi être reconnue par le ligand ESL qui lie les E-sélectines (Whelan, 1996) (Figure I 4).

La troisième phase, le « **triggering** » permet l'adhésion ferme des monocytes à l'endothélium via l'interaction des intégrines leucocytaires avec des CAM endothéliales (Cell Adhesion Molecule). Les intégrines sont composées de deux chaînes α et β qui lient soit des constituants de la MEC (Matrice extra-cellulaire), des protéines du plasma (vitronectine, fibrinogène) ou des contre-récepteurs de type CAM : Mad CAM-1, ICAM-1 (induite dans un contexte inflammatoire), VCAM-1. L'activation des intégrines résulte de l'activation cellulaire qui suit la liaison des sélectines à leurs ligands (Prost *et al.*, 2000).

La **diapédèse** est le processus de migration proprement dit du monocyte à travers l'endothélium. Cette étape de transmigration à travers l'endothélium est assurée entre autres par l'interaction entre des molécules d'adhérence appelées PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) qui sont exprimées sur les monocytes et les cellules endothéliales (Dunon, 1996).

Une fois la barrière endothéliale traversée, le monocyte subit une étape de **différenciation** en macrophages par l'action du M-CSF qui active aussi la prolifération des macrophages (Glass *et al.*, 2001).

La dispersion des monocytes à travers l'organisme semble se faire au hasard et la distribution des macrophages résidants est modélisée selon leur micro-environnement. Cette dispersion est homogène mais, lors d'une infection ou d'un traumatisme, il y aura un recrutement local de monocytes et ce, suite à l'augmentation de l'expression d'adhésines à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux qui faciliteront l'attachement des monocytes (Auger *et al.*, 1992).

Lorsque les monocytes périphériques migrent du compartiment vasculaire vers le compartiment extra-vasculaire, un processus entraînant la maturation de ces cellules en macrophages est lancé. Le processus de différenciation rend les cellules prêtes pour une participation active dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Il a été démontré que ce processus dépend de nombreux facteurs de transcription, et un rôle particulier pour NF- κ B

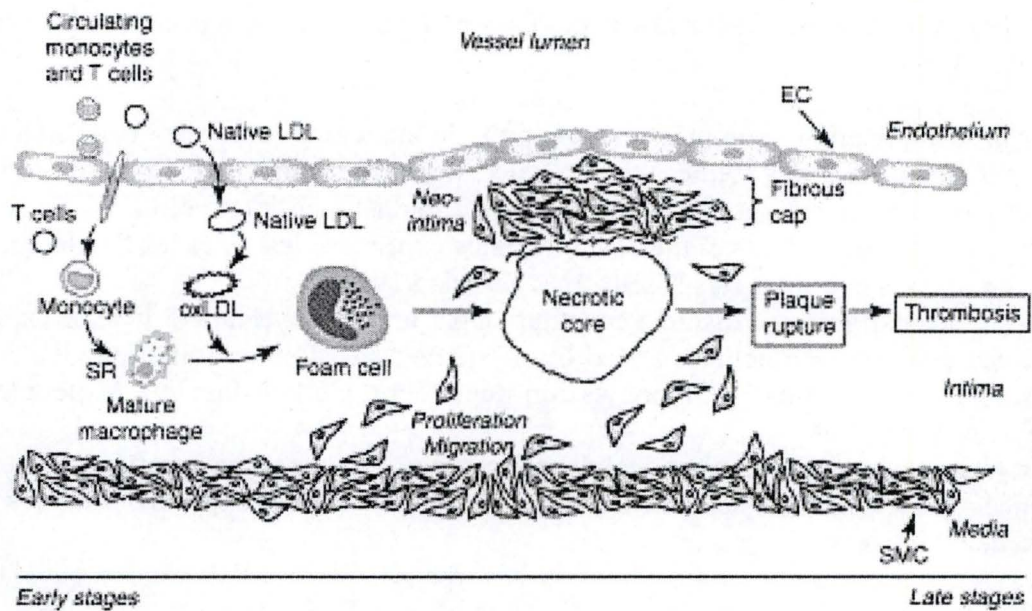


Figure I 5 : Modèle de développement d'une lésion athérosclérotique. Durant les phases précoces de la formation de la lésion, les monocytes circulants migrent à travers la barrière endothéliale (EC) et se différencient en macrophages matures sous l'effet du M-CSF. En parallèle, les LDL passent la barrière endothéliale à des sites de perméabilité accrue. Dans l'intima, elles s'oxydent progressivement jusqu'à un stade de LDL oxydés (oxLDL). Celles-ci induisent ensuite la formation des cellules spumeuses qui ensuite interviennent dans la formation du cœur nécrotique. L'évolution du processus inflammatoire peut mener à la rupture de la plaque d'athérosclérose et à la thrombose dans ses dernières étapes (Duval *et al.*, 2002)

(décrit au point II A 2.3) a été suggéré étant donné son accumulation dans le cytoplasme des cellules différenciées en macrophages (Osterud *et al.*, 2003). Le facteur PPAR γ joue quant à lui un rôle actif dans l'homéostasie lipidique des macrophages (Ricote *et al.*, 2004) comme nous le verrons au paragraphe II B.

IC. Rôle des Macrophages

Selon leur localisation tissulaire, les macrophages ont différents noms et morphologies. On en retrouve dans le foie (cellules de Kupffer), dans la rate et les différents tissus lymphoïdes, dans les poumons (macrophages alvéolaires), dans les os et les tissus conjonctifs (ostéoclastes et chondroclastes), dans la moëlle osseuse, dans les cavités séreuses, dans la peau, dans les tractus urogénital et gastro-intestinal et même dans le système nerveux central (microglies) (Bosque *et al.*, 1997).

Les macrophages sont présents dans toutes les étapes de l'athérogenèse. Leur rôle est d'agir non seulement comme une cellule présentatrice d'antigène aux lymphocytes T, mais aussi comme une source de facteurs de croissances, de cytokines et de protéines pro-coagulantes comme le TF (Tissue Factor) (Duez *et al.*, 2001). Le macrophage est donc le principal médiateur inflammatoire dans le micro-environnement de la plaque athéromateuse (Ross, 1993) et il est la principale source de cellules spumeuses qui jouent un rôle très important dans la formation de la plaque athéromateuse.

Les cellules spumeuses sont issues de l'accumulation lipidique dans des cellules de lignée monocyttaire, mais aussi de lignée myocytaire se trouvant dans l'intima artérielle (Naito *et al.*, 1997). Ces cellules deviennent envahissantes à cause de leur trop grande accumulation et perturbent ainsi l'intégrité de la paroi du vaisseau sanguin. Une accumulation de cellules spumeuses et de cellules nécrosées entraîne la formation de cristaux de cholestérol eux-mêmes responsables d'une réaction inflammatoire (Figure I 5).

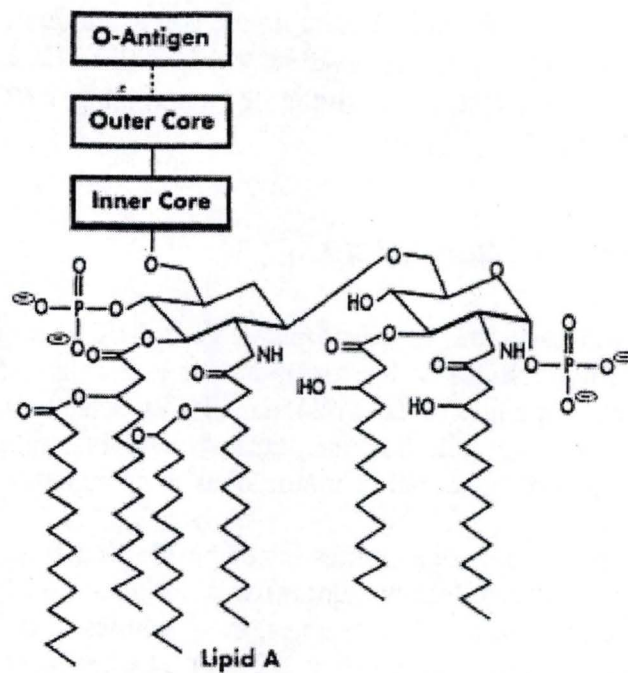


Figure I 6 : Structure schématique du LPS (Guha *et al.*, 2001)

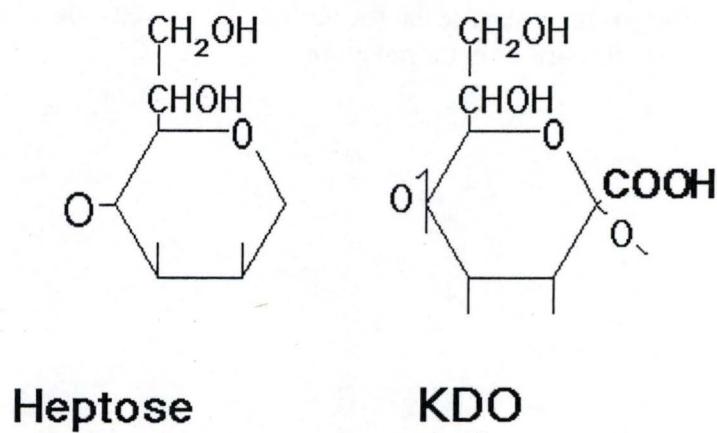


Figure I 7 : Représentation schématique des sucres du core du LPS: l'heptose et le KDO (2-keto-deoxyoctonoic acid) (http://www.cvm.uiuc.edu/courses/vp331/Structures_in_pathogenesis1.html)

II. Mécanismes moléculaires de l'activation des monocytes-macrophages

II A. *Modèle pro-inflammatoire : stimulation avec le LPS*

Le lipopolysaccharide (LPS) est connu pour induire une réponse inflammatoire chez les monocytes-macrophages, les cellules endothéliales et dans d'autres types cellulaires (Dunzendorfer *et al.*, 2004). Les monocytes et les macrophages sont extrêmement sensibles au LPS et y répondent en sécrétant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Ronni *et al.*, 2003).

Les points suivants reprennent la description générale du LPS et des voies de transduction du signal activées par celui-ci.

1. *Description du LPS*

Le lipopolysaccharide ou endotoxine bactérienne est une molécule complexe de poids moléculaire de plus de 10.000 Dalton qui varie largement en composition à la fois entre - et - dans les groupes de bactéries Gram négatives, dont il est le principal composant de la membrane externe. Bien que chimiquement différent des phospholipides, le LPS possède des propriétés physico-chimiques suffisamment semblables pour pouvoir participer à la formation d'une membrane. Une extrémité hydrophobe de la molécule est insérée dans la membrane, l'autre pôle est hydrophile et reste en surface. La structure de cette molécule est formée de trois parties, le lipide A, le core et la chaîne O (Figure I 6).

Le lipide A connu sous le nom de l'endotoxine bactérienne est la partie hydrophobe du LPS servant d'ancrage membranaire ; il est constitué d'un dimère phosphorylé de glucosamine sur lequel sont greffées plusieurs molécules d'acides gras saturés à 14 carbones.

Le core est une courte série de sucres attachés sur un des sucres aminés du lipide A. Sa structure est relativement constante parmi les bactéries Gram-négatives et comprend deux sucres inhabituels : le KDO (2-keto-deoxyoctonoic acid) et l'heptose (Figure I 7).

La dernière partie, la chaîne O ou l'antigène O, généralement plus longue que le core, est constituée d'unités tri-, tétra- ou pentasaccharidiques répétées de nombreuses fois (Kielian *et al.*, 1995).

Les chocs septiques causés par les bactéries Gram-négatives, représentent un problème médical sérieux associé à un taux de mortalité élevé. Aux Etats-Unis, approximativement 500.000 personnes souffrent de septicémies et 175.000 en meurent chaque année. On a estimé que 40 % des cas de septicémies sont originaires d'une infection aux bactéries Gram-négatives (Kielian *et al.*, 1995, Guha et Mackman, 2001).

La stimulation au LPS des monocytes et des macrophages active de nombreuses voies de transduction du signal, notamment les facteurs nucléaires NF- κ B et AP-1 qui induisent l'expression de nombreux gènes encodant des médiateurs de l'inflammation.

Le chapitre suivant traite des différentes voies de transduction du signal activées par le LPS.

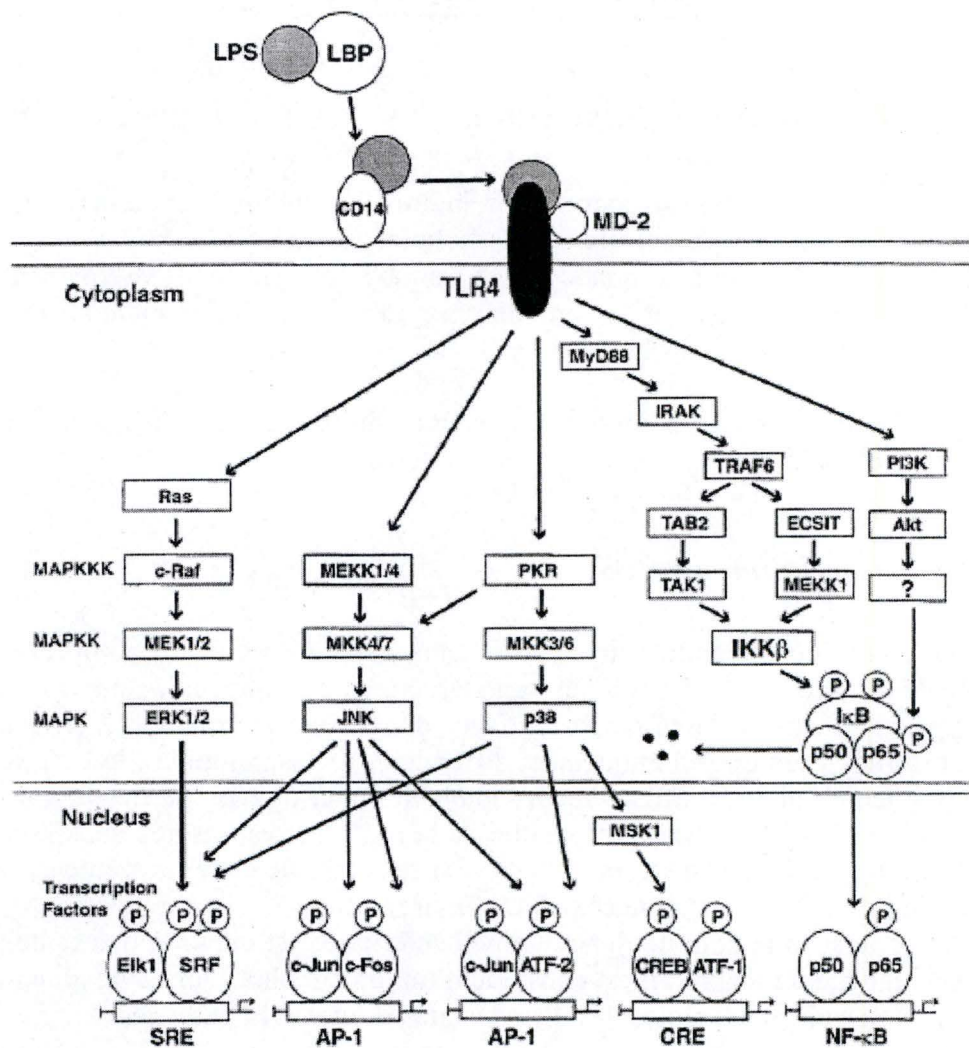


Figure I 8 : Schéma des différentes voies de transduction du signal activées par la liaison du LPS à son récepteur TLR4. Les protéines associées LBP, CD14 et MD-2 sont également renseignées (Guha *et al.*, 2001)

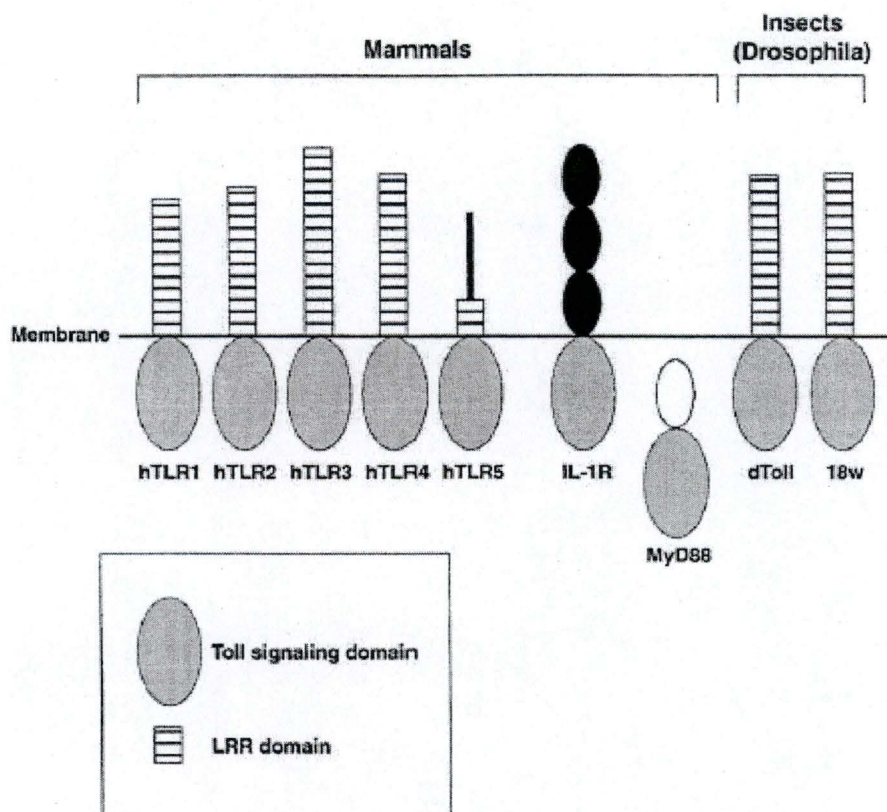


Figure I 9 : Représentation schématique des membres de la famille TLR. Les récepteurs sont au nombre de 10 chez les mammifères et de deux chez la drosophile. On retrouve aussi dans cette famille le récepteur à l'IL-1 (IL-1R) et l'adaptateur protéique MyD88 (Guha *et al.*, 2001)

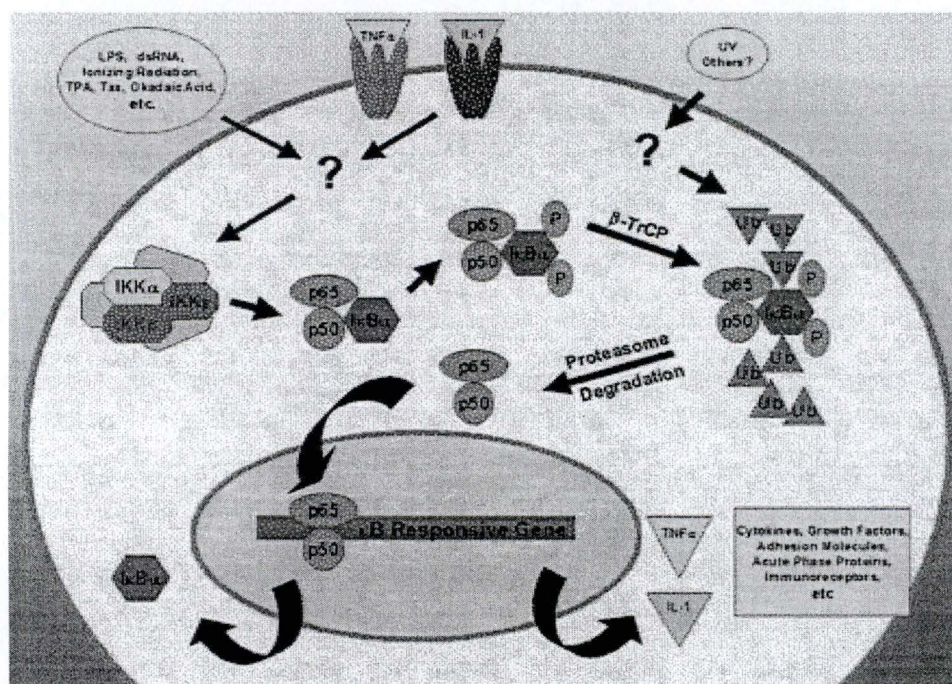


Figure I 10 : Voie d'activation du facteur de transcription NF-κB par divers agents pro-inflammatoires (Rothwarf *et al.*, 1999)

2. Voies de transduction du signal activées par le LPS

2.1. Le LPS et son récepteur le TLR4

Pour que le LPS puisse être reconnu par la cellule, celui-ci doit former un complexe avec une protéine plasmatique de 60 kDa produite par le foie, connue sous le nom de LBP (LPS Binding Protein) ainsi qu'avec la molécule CD14 (Kielian *et al.*, 1995, Amura *et al.*, 1998). La molécule CD14, une glycoprotéine de 55 kDa, est un marqueur de différenciation exprimé à la surface des monocytes et des macrophages. Il est aussi ancré en membrane via une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol). Ce marqueur est aussi connu comme antigène de surface pouvant être en membrane ou soluble. Si le CD14 peut bien être considéré comme un récepteur à haute affinité pour le LPS, favorisant l'activation des macrophages à des concentrations en LPS très basses (de l'ordre du subnanogramme), il est clair qu'il n'est pas le récepteur responsable de la signalisation induite par le LPS, étant donné son ancrage en membrane via une ancre GPI. C'est le récepteur TLR4, de la famille des « Toll Like Receptors » qui s'avère être ce récepteur. La reconnaissance du LPS par TLR4 nécessite une molécule supplémentaire : la protéine MD-2 qui forme un complexe avec le domaine extracellulaire de TLR4. Elle permet une reconnaissance efficace du LPS par le TLR4 (Toll Like Receptor 4) (Figure I 8).

Comme déjà mentionné, le récepteur TLR4 fait partie d'une famille de récepteurs connue sous le nom de Toll Like Receptor (TLR) (Figure I 9) et composée de dix récepteurs (TLR1-10). Cette famille de récepteurs transmembranaires est caractérisée par un domaine extracellulaire, contenant de nombreuses répétitions riches en leucines ou LRR (Leucine Rich Repeats), qui serait impliqué dans la reconnaissance des pathogènes (comme le LPS), et d'un domaine trans-membranaire simple se référant à un motif TIR (Toll/IL-1R/Resistance). Le motif TIR des TLR, comme son nom le suggère, présente une homologie avec le domaine de type I du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) (Zhang *et al.*, 2001, Yamamoto *et al.*, 2004).

2.2. Voies de signalisation activées par le LPS (figure I 8)

a. Les kinases en amont de NF- κ B

Le LPS va activer les facteurs MyD88, IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase) et TRAF6 (TNF- α Receptor Associated Factor-6). Ce sont eux qui par l'intermédiaire des deux kinases TAK1 (TGF β Associated Kinase 1) et MEKK1 (Mitogen Activated Protein Kinase ERK Kinase Kinase 1) et du complexe IKK, vont permettre la dégradation de I κ B α (Guha et Mackman, 2001). Le complexe IKK (pour I κ B-Kinase) est lui-même constitué de deux kinases, IKK- α et IKK- β , et de la protéine NEMO (ou IKK- γ) qui structure l'ensemble. La dégradation d'I κ B est initiée par la phosphorylation de deux résidus sérines (Ser 32 et Ser 36) suivie par une poly-ubiquitinylation sur des résidus lysines permettant la dégradation d'I κ B par le protéasome 26S. La libération du dimère NF- κ B (en général p65-p50) induit l'exposition d'un site NLS (Nuclear Localisation Site), qui permet ensuite la translocation du dimère dans le noyau et la transcription des gènes cibles (figure I 8 et I 10) (Silvermann *et al.*, 2001).

Cytokines pro-inflammatoires	TNF α
	IL-1 β
	IL-2
	IL-6
	GM-CSF
	M-CSF
	G-CSF
Chémokines	IL-8
	MCP-1
	MIP-1 α
	Gro- α , - β et - γ
	Eotaxin
Enzymes inflammatoires	iNOS
	COX2
	5-Lipoxygénase
	c-PLA ₂
Protéines d'adhérence	ICAM-1
	VCAM-1
	E-sélectine
Récepteurs	Récepteur à l'IL-2
	Récepteur aux lymphocytes-T

Tableau I 1 : Liste non exhaustive de protéines dont l'expression génique est régulée par NF- κ B
(d'après Barnes *et al.*, 1997 et Barnes *et al.*, 1997)

Par ailleurs le domaine trans-activateur C-terminal de p65, peut être phosphorylé, ce qui augmente son activité trans-activatrice. En présence d'IL-1, cette phosphorylation est favorisée par la voie PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase)- AKT. La kinase impliquée pourrait être la PKC ξ , déjà identifiée dans la voie PI3K-AKT dans les monocytes humains stimulés par le LPS. La GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β), également en aval de la voie PI3K-AKT pourrait également être impliquée (pour revue voir Guha et Mackman, 2001) (figure I 8).

b. La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

Les cascades de MAPK sont composées de MAP Kinases (MAPK), MAPK Kinases (MAPKK) et MAPKK Kinases (MAPKKK).

Les trois voies de MAPK activées par le LPS sont la voie des ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), la voie des JNK (Jun N-terminal Kinase) et la voie de p38 (pour revue voir Guha et Mackman, 2001).

La première voie d'activation est la cascade des Ras, c-raf (= MAPKKK), MEK1/2 (Mitogen activated protein Kinase ERK Kinase) (=MAPKK) et ERK1/2. Une fois la petite protéine G Ras activée, ces différentes kinases sont activées à leur tour par phosphorylation et activent le facteur de transcription Elk-SRF (Voir II A 2-C.C2). Guha et al. (2001) ont démontré que cette voie était impliquée dans l'expression induite du TF (Tissue Factor) et du TNF- α par des cellules monocytaires activées au LPS. L'utilisation de mutants dominants négatifs a clairement démontré le rôle de Ras, Raf-1 et ERK1/ERK2.

La seconde voie activée est la voie des JNK. Cette voie kinasique faisant intervenir trois acteurs : MEKK1/4 (Mitogen activated protein Kinase ERK Kinase Kinase 1/4), puis MKK4/7 et enfin JNK. La JNK va phosphoryler différents facteurs de transcription tels que Elk-SRF, c-Jun, ATF-2, ERK-1 et AP-1 (Voir II A-2.3).

La troisième voie activée est celle de p38, celle-ci fait intervenir PKR (Protein Kinase RNA-Regulated), MKK3/6 (Mitogen activated protein Kinase Kinase 3/6) et p38. A nouveau, cette voie va permettre la phosphorylation de facteurs de transcription tels que CREB, AP-1 et Elk-SRF.

2.3. Facteurs de transcription activés par le LPS

a. NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor κ B) a été initialement décrit comme facteur de transcription nécessaire à la transcription de la chaîne légère κ dans les lymphocytes B de souris (Sen *et al.*, 1986 et Barnes, 1997). Ce facteur de transcription, tout en régulant l'expression d'une multitude de gènes immunitaires et inflammatoires (tableau I 1), joue un rôle critique dans la défense de l'hôte contre les pathogènes et dans les maladies chroniques inflammatoires.

Contrairement à la plupart des facteurs de transcription, en absence de stimulation, le facteur de transcription NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par des protéines répresseurs

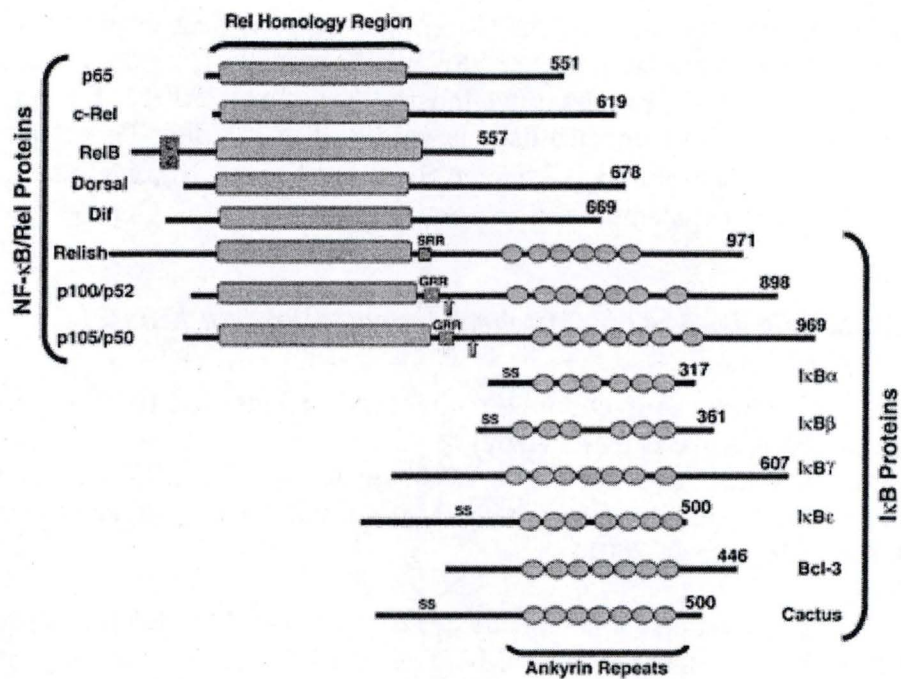


Figure I 11 : Représentation schématique de la famille des protéines Rel/NF- κ B, avec leurs différents domaines structuraux pour les protéines NF- κ B et I κ B (Rothwarf *et al.*, 1999)

nommées IκB (Inhibitory κB protein). La stimulation de NF-κB se fait par une multitude de molécules différentes incluant les cytokines inflammatoires, les chémokines, les molécules d'adhérence cellulaire, les intermédiaires réactifs de l'oxygène et les microorganismes, permettant classiquement la dégradation de l'inhibiteur IκB et donc la libération du complexe dimérique NF-κB (Collins *et al.*, 2001). La dissociation d'IκB et de NF-κB permet l'exposition du signal de localisation nucléaire (NLS) sur la protéine NF-κB, résultant en sa rapide translocation dans le noyau, qui est suivie par sa fixation à sa séquence consensus 5'-GGGRNNTYCC-3' (*R*= G ou A, *Y*= C ou T, *N* = n'importe quel nucléotide), située dans le promoteur des gènes cibles (De Martin *et al.*, 2000).

Le complexe NF-κB se présente sous forme d'un hétérodimère associant différentes protéines de la famille Rel/NF-κB (Siebenlist *et al.*, 1994). Les protéines de cette famille partagent une région de 300 acides aminés formant deux domaines « immunoglobulin-like » connus sous le nom de « Rel Homology Domain » (RHD). Les RHD jouent un rôle dans la dimérisation, la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN et l'interaction avec les inhibiteurs de NF-κB (Collins *et al.*, 2001). La famille des protéines Rel/NF-κB est composée de deux groupes de protéines présentant des différences au point de vue structural et fonctionnel (Siebenlist *et al.*, 1994 et Piret *et al.*, 1996).

Le premier groupe (classe 1) se compose des protéines p50 (NF-κB1) et p52 (NF-κB2) formées respectivement à partir des protéines p100 et p105 et Relish. Le second groupe (classe 2) se compose des protéines p65 (RelA), c-Rel, RelB, v-Rel (Wardle, 2001), ainsi que des protéines drosophiliennes Dorsal et Dif (Rothwarf *et al.*, 1999) (Figure I 11). Théoriquement, toutes les associations entre les différentes protéines de classe 1 et 2 sont possibles. Cependant certaines associations sont rares (RelA/RelA, RelA/Rel, Rel/Rel), voire même inexistantes (RelB/RelB, RelB/Rel). Le dimère le plus rencontré est composé des sous-unités p50 et p65.

La famille d'IκB quant à elle, se compose des protéines IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, Bcl-3, des précurseurs de NF-κB1 (p105) et NF-κB2 (p100) ainsi que de la protéine drosophilienne « Cactus » (Rothwarf *et al.*, 1999) (Figure I 11). Toutes les protéines de la famille d'IκB sont caractérisées au niveau de leur structure par un domaine fortement conservé présentant un nombre variable de motifs ankrynes (six à sept). Ce domaine en forme d'hélice se lie au RHD du dimère NF-κB et masque ainsi le NLS, ce qui empêche sa translocation nucléaire.

Le facteur NF-κB possède une multitude de gènes cibles dont IκBα, ce qui permet de régénérer le pool cytoplasmique de son propre inhibiteur. Ce système d'autorégulation permet d'assurer que l'induction de NF-κB ne soit que transitoire et que la cellule activée retourne bien dans son état de quiescence (Collins *et al.*, 2001).

b. AP-1

Le facteur de transcription AP-1 (Activated Protein 1) est un dimère composé de 2 protéines de la famille Fos et Jun (Ozanne *et al.*, 2000). Ce facteur de transcription peut être hétéro- ou homo-dimérique (Jun/Fos, Jun/ATF1, Jun/ATF2, Jun/Jun), mais le dimère Fos/Fos est inexistant (Neuberg *et al.*, 1989). Au repos, l'hétérodimère se trouve dans le noyau et ses sites de liaison à l'ADN sont phosphorylés 3 fois par une kinase constitutive, la GSK3. Ces phosphorylations empêchent l'interaction entre le facteur de transcription chargé négativement et l'ADN chargé de la même manière, il y a donc répulsion.

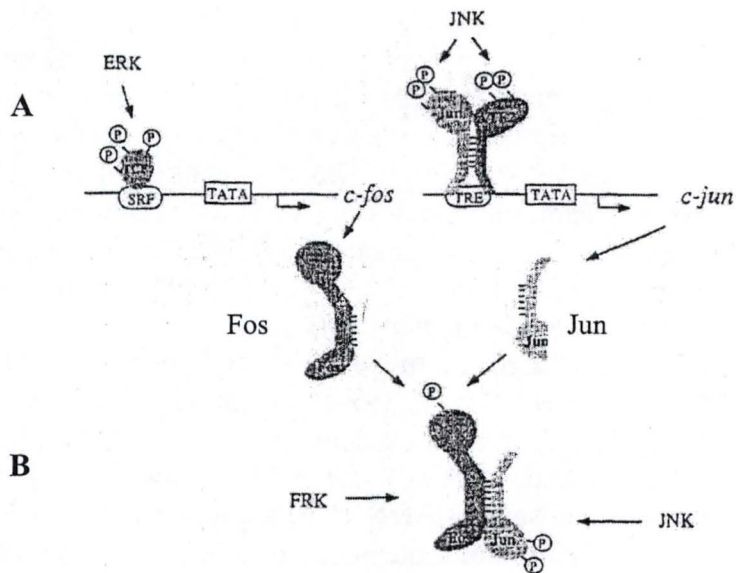


Figure I 12 : Mécanisme d'activation de AP-1. A- Dans un premier temps, une kinase phosphoryle les deux sous unités de AP-1, ce qui permet l'activation du facteur de transcription et la transcription des gènes cibles. B- Les deux sous unités de AP-1 hétérodimérisent et sont phosphorylées 3 fois, ce qui empêche les interactions avec l'ADN (Karin, 1995)

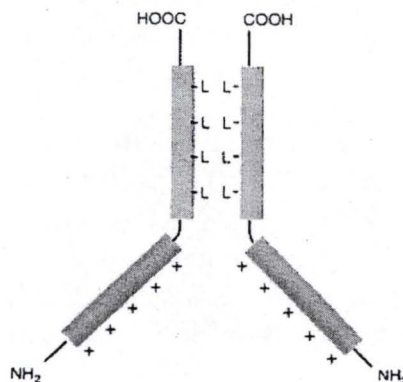


Figure I 13 : Modèle de type *basic leucine Zipper* : le domaine basique hélicoïdal permet la fixation à l'ADN tandis que le domaine hélicoïdal contenant les leucines sert à la dimérisation (Watson, 1994)

Médiateurs inflammatoires	Gènes
Cytokines	TNF- α
	IL-1
	IL-6
	G-CSF
	GM-CSF
	M-CSF
Chémokines	IL-8
	MCP-1
Récepteurs	Tissue Factor
	IL-2 α
Facteurs de Transcription	p50
	c-Rel
	Egr-1
	IRF-1
Inhibiteur	I κ B α
Autres	iNOS

Tableau I 2 : Gènes connus comme étant induits par le LPS dans les monocytes-macrophages (d'après Guha et Mackman., 2001)

L'activation de AP-1 se déroule en deux étapes, la première réalisée par une phosphatase inhibée par la GSK3 et activée par la PKC. Elle clive les 3 phosphates situés sur chacune des sous-unités de AP-1. Cette déphosphorylation permet la liaison du dimère sur la séquence consensus TRE (TPA Responsive Element) TGAGTCAG.

La seconde étape, réalisée par une MAPK consiste à phosphoryler 2 fois les domaines de transactivation, ce qui permet ainsi l'activation du facteur de transcription et la transcription des gènes cibles (Karin, 1995) (figure I 12).

c. Elk-1-SRF

Le facteur de transcription Elk-SRF (Serum Response Factor) se lie au SRE (Serum Response Element) situé dans le promoteur d'une variété de gènes comprenant entre autre c-Fos, FosB et JunB. La séquence consensus reconnue par le dimère SRF/Elk-1, une région riche en A/T, est flanquée de part et d'autre d'un motif 5'-CCATATTAGG-3' en répétition inverse. SRF peut-être activé par divers agents : le sérum, le LPA (Lysophosphatidic Acid), l'anisomysine, le LPS et d'autres stimuli extracellulaires comme les antioxydants et les UV (Ultraviolets) (Chai et Tarnawski, 2002).

d. CREB/ ATF-1

La famille des facteurs de transcription ATF/CREB représente un large groupe de protéines appartenant à la famille des leucines Zippers (figure I 13), dont le facteur le plus connu est CREB (cAMP Response Element Binding-protein).

Le facteur de transcription qui lie la séquence consensus CRE (cAMP Response Element) est un hétérodimère composé des protéines CREB et ATF-1 (Activated Transcription Factor-1). Une fois activé par le LPS, le facteur dimérise et se lie sur le site de liaison CRE qui contient la séquence consensus 5'-TGACGTCA-3' (Hai *et al.*, 2001).

2.4. Les gènes cibles activés par le LPS

Les gènes induits par les voies de signalisation activées par le LPS chez les monocytes-macrophages sont des gènes ayant un rôle dans la réponse inflammatoire. Ces gènes encodent des médiateurs inflammatoires comme les cytokines et les chémokines, mais aussi pour des facteurs de transcription, des inhibiteurs, des molécules d'adhérence et même des récepteurs (Tableau I 2) (Guha et Mackman, 2001). Parmi ces gènes, la plupart sont régulés par NF- κ B (Tableaux I 1 et I 2). Guha et al (2001) ont cependant montré que l'induction par le LPS du gène Egr-1 était dépendant de la voie des ERK1/2 et du facteur transcriptionnel Elk-SRF. Celui-ci induisant dans un deuxième temps, en association avec AP-1 et NF- κ B, l'expression du TF.

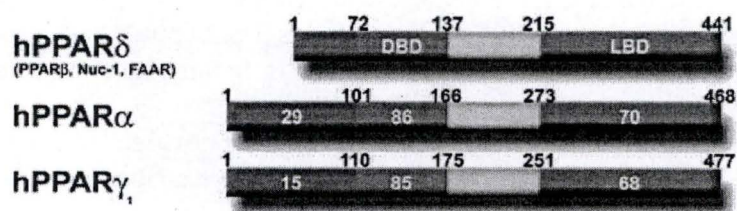


Figure I 14: Structure générale des trois isotypes de PPARs (Rosen *et al.*, 2001)

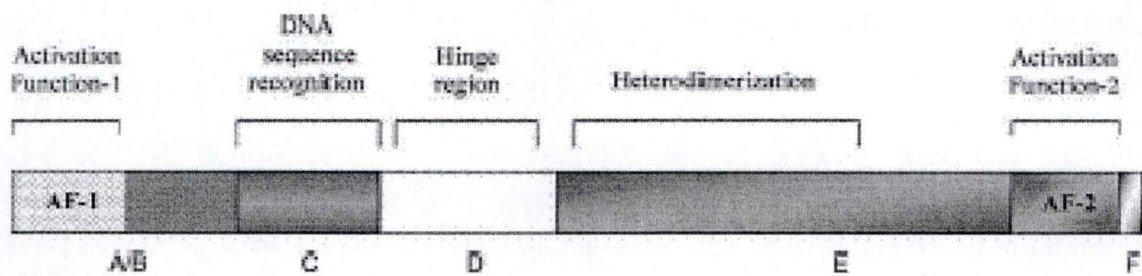


Figure I 15 : Représentation schématique des différents domaines fonctionnels des PPARs (Blanquart *et al.*, 2003)

II B. *Modulation de l'inflammation : les PPARs*

Le LPS induit une réponse pro-inflammatoire via les différents facteurs de transcription décrits ci-dessus. Une autre famille de facteurs de transcription activés par des ligands, a attiré notre attention, car les données récentes de la littérature lui attribuent un rôle modulateur dans l'inflammation : il s'agit des Peroxysomes Proliferator Activated Receptors (ou PPAR) (Delerive *et al.*, 2001, Blanquart *et al.*, 2003)

Les PPARs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription qui régulent le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, l'homéostasie du glucose et l'inflammation. Ils ont aussi un rôle dans l'adipogenèse (Welch *et al.*, 2003 ; Ricote *et al.*, 2004), ainsi que dans la sensibilité au glucose (Francis *et al.*, 2003). Quant à leur nom, il est purement historique, les PPARs (et plus particulièrement le PPAR α), ont été décrits en 1990, comme étant les médiateurs de la réponse aux agents induisant la prolifération des peroxysomes chez les rongeurs, tels les fibrates. Les PPARs n'induisent pas la prolifération des peroxysomes chez l'homme.

1. Structure

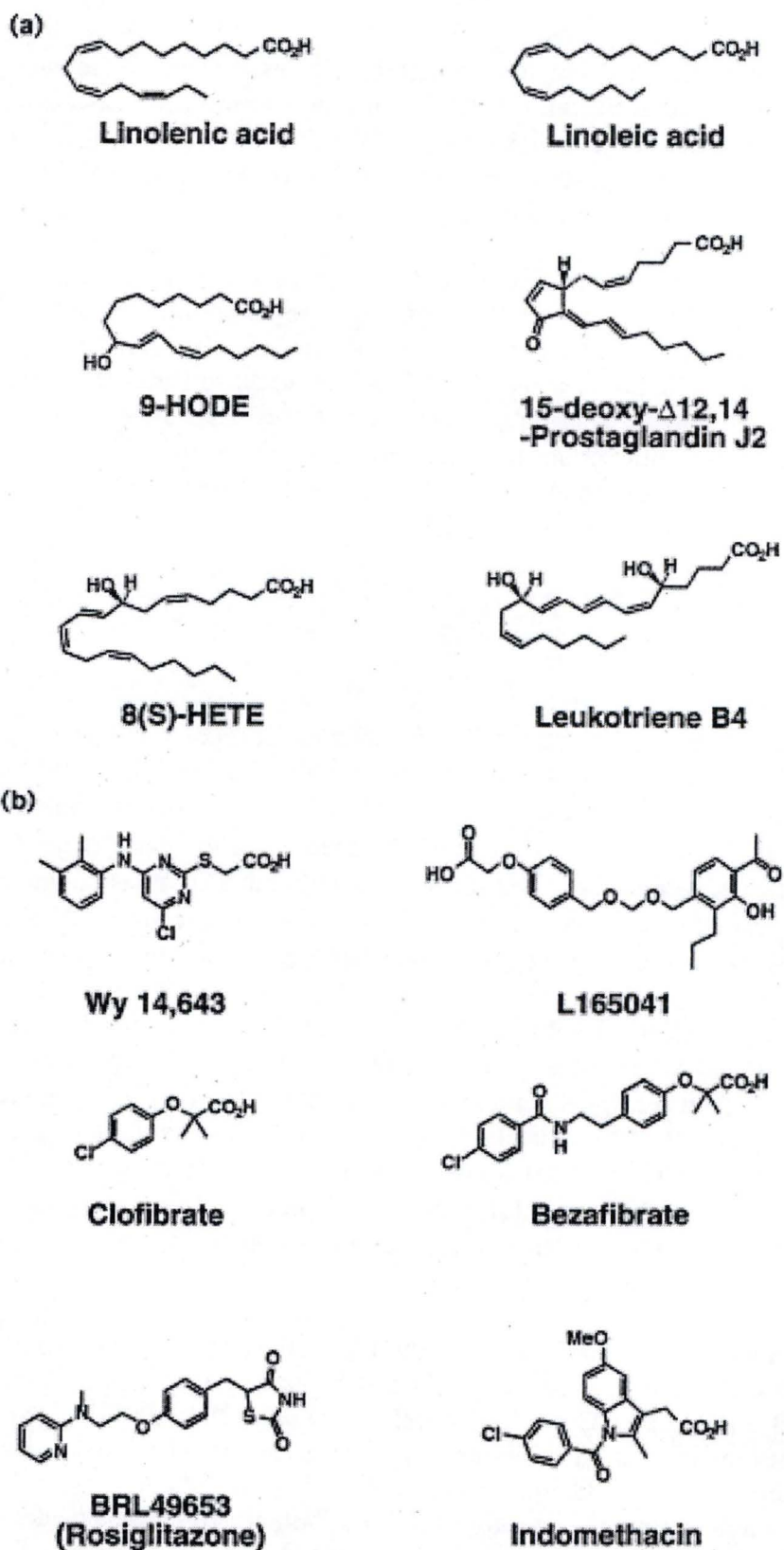
La famille des protéines PPARs est formée de trois isotypes issus de gènes différents mais comportant cependant une structure fort semblable (Figure I 14) : PPAR α , PPAR δ/β et PPAR γ (Puddu *et al.*, 2003). Dans le cas de l'isotype γ , une distinction est réalisée entre les isoformes $\gamma 1$ et $\gamma 2$ qui sont issus d'un épissage alternatif d'un même gène (Cock *et al.*, 2004). La différence entre le PPAR $\gamma 1$ et $\gamma 2$ réside dans le nombre d'exons codant pour chacune des isoformes, $\gamma 1$ est encodé par 8 exons alors que $\gamma 2$ est lui encodé par 6 exons. Le PPAR $\gamma 2$ possède 28 acides aminés supplémentaires dans sa région amino-terminale (Cock *et al.*, 2004).

Différents sous-types de PPARs ont été identifiés chez plusieurs espèces de vertébrés : le xénope, la souris, le rat, le hamster et l'homme. Les gènes codant pour PPAR α , δ/β et γ sont localisés chez la souris respectivement sur les chromosomes 15, 17 et 6, et chez l'homme le gène pour le sous-type α a été localisé sur la région chromosomique 22q12-22q13.1, pour le sous-type γ sur la région chromosomique 3p25 et pour le sous-types β/δ sur la région chromosomique 6p21.2-p21.1. La position des introns dans les séquences codantes est fortement conservée entre les trois isotypes, ce qui suggère que les gènes sont dérivés d'un gène ancêtre commun (Lemberger *et al.*, 1996).

Comme les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, les PPARs sont organisés en cinq domaines fonctionnels distincts : la partie amino-terminale nommée le domaine A/B, un domaine C qui lie l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain), une région charnière ou domaine D, un domaine E qui fixe les ligands (LBD pour Ligand Binding Domain) et un domaine F (Blanquart *et al.*, 2003) (Figure I 15).

Le domaine amino-terminal - domaine A/B - est faiblement conservé entre les trois isotypes de PPARs. Il possède une fonction d'activation (AF-1 pour Activation Function 1) ligand-indépendante. Il a été prouvé que son état de phosphorylation contribue à la modulation de l'activité des PPAR α et γ .

Le domaine central de liaison à l'ADN - domaine C ou DBD - est hautement conservé, avec ses deux structures en doigts de zinc et son hélice- α de liaison à l'ADN.



Current Opinion in Biotechnology

Figure I 16 : Structure des ligands naturels (a) et synthétiques (b) des PPARs (Michalik *et al.* 1999)

	PPAR α	PPAR γ
Ligands naturels		
<i>Acides Gras</i>		
acide linoléique	+	-
acide arachidonique	+	+
acide palmitique	+	-
<i>Eicosaenoides</i>		
15dPGJ2	-	+++
PGJ2	+	++
12-HETE	++	NA
15-HETE	NA	+
LTB4	+++	NA
ox-LDL	+	++
9-HODE	++	++
13-HODE	++	++
Ligands synthétiques		
WY 14,643	++	+
Fibrates	++	\pm
Glitazones	-	++
NSAIDs	+	+

Tableau I 3 : Tableau reprenant l'affinité de différents ligands des PPAR α et PPAR γ (Duez *et al.*, 2001)

(- = pas de liaison, \pm = affinité faible, + = forte affinité, ++ = très forte affinité, ND = Non déterminé)

	PPAR α	PPAR β/δ	PPAR γ
High affinity agonists (<1 μ M)	<i>8-HETE</i> <i>8-HEPE</i> <i>LTB₄</i> LG100268 ^a BM 17.0744 GW7647 GW9578	L-165,041 GW501516 Compound F	Rosiglitazone Pioglitazone Troglitazone GW1929 GW7845 LY171 833 LG100268 ^a CDDO KRP-297 SB-219994 GI262570 JTT-501 GW0207 Az-PC
High affinity dual agonists	L-783,483 Compound 8 DRF 2725 AZ 242 LY465608 GW6471 GW9544	L-783,483	Compound 8 DRF 2725 AZ 242 LY465608 GW6471 GW9544
Medium affinity agonists (low μ M)	<i>15d-PGJ₂</i> <i>PGA₁</i> <i>12-HETE</i> WY-14,643	<i>15d-PGJ₂</i> <i>PGI₂</i> <i>cPGI₂</i> <i>PGA₁</i>	<i>15d-PGJ₂</i> <i>9-HODE</i> <i>13-HODE</i> <i>15-HETE</i> <i>αLDL</i> <i>PGA₁</i>
Low affinity agonists (high μ M–mM)	NSAIDs Fibrates <i>ETYA</i> <i>DA</i> <i>LA</i> <i>AA</i>	<i>ETYA</i> <i>DA</i> <i>LA</i> <i>AA</i> <i>EPA</i>	NSAIDs <i>ETYA</i> <i>DA</i> <i>LA</i> <i>AA</i> BADGE
SPARMs			F-L-Leu LG100641 Rosiglitazone ^b
Partial agonists			GW0072 L-764406 MCC-555
Antagonists	GW6471 MK886	Sulindac	BADGE Diclofenac GW9662 SR-202 T0070907 PD068235 CDDO-Me

Tableau I 4 : Les ligands des PPARs classés en fonction de l'affinité, de la nature du ligand (SPARMs) et de leur rôle (agonistes/antagonistes) (Bishop-Bailey *et al.*, 2003)

Le domaine D ou CTE (DBD Carboxy-Terminal Extension) représente une extension du domaine C et une boucle connectant les domaines C et E.

Le domaine E est celui qui fixe les ligands, qui sert d'intermédiaire pour la transactivation dépendante des ligands et qui fournit l'interface de dimérisation (Michalik *et al.*, 1999). Ce domaine E comprend un autre domaine d'activation (AF-2), qui contrairement au premier domaine d'activation ligand-dépendant (AF-1), est nécessaire pour l'hétérodimérisation avec RXR qui sera développé au paragraphe II B.4.

En ce qui concerne le domaine F, aucune fonction ne lui a été découverte jusqu'à présent (Blanquart *et al.*, 2003).

2. Localisation et distribution tissulaire des PPARs

Les distributions tissulaires et niveaux d'expression sont très différents pour les trois isotypes de PPAR (Chinetti *et al.*, 2001). Les récepteurs PPAR α sont principalement exprimés dans les tissus caractérisés par un taux élevé du métabolisme des acides gras, comme le foie, les reins, le cœur et les muscles (Braissant *et al.*, 1996). Les PPAR γ sont fortement exprimés dans le tissu adipeux brun et blanc et les intestins, mais ils peuvent aussi être détectables dans les glandes mammaires et dans un grand nombre d'autres tissus. Plus particulièrement, les PPAR γ 1 sont largement exprimés entre autres dans les macrophages, alors que les PPAR γ 2 ne sont exprimés que dans le tissu adipeux. D'autre part, ces deux isotypes se retrouvent aussi dans certains types cellulaires et dans les parois des vaisseaux sanguins : les PPAR α et γ sont présents dans les cellules endothéliales, dans les cellules musculaires lisses et dans les monocytes-macrophages. Quant aux PPAR δ/β , ceux-ci sont exprimés dans une vaste étendue de tissus incluant le cœur, le tissu adipeux, le cerveau, les intestins, les muscles, les poumons et les glandes adrénergiques (Chinetti *et al.*, 2001).

3. Ligands des PPARs

Les ligands des récepteurs PPARs recouvrent une large gamme de composés naturels ou synthétiques illustrés à la figure I 16.

3.1. Ligands Naturels des PPARs

La majeure partie des ligands naturels des PPARs est produite par les voies de dégradation des acides gras et des voies métaboliques liées aux écosanoïdes.

Les PPARs agissent comme des senseurs lipidiques, en fixant des ligands dérivés de métabolismes intracellulaires fort divers aussi bien que des lipides issus du régime alimentaire (Barish *et al.*, 2004). Les 3 isotypes de PPAR (α , β/δ , γ) lient les acides gras, mais avec des affinités différentes (Michalick *et al.*, 1999) (Tableau I 3 et Tableau I 4).

PPAR α est non seulement le récepteur qui possède l'affinité la plus élevée pour les acides gras, mais il est aussi celui des trois isotypes qui est le mieux caractérisé au niveau de la

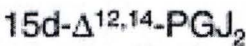
CC1=C(C=C(C=C1)SCC2=C(C)N=C(C2)c3ccc(cc3)C(F)(F)F)COC(=O)O

Figure 1 18 : Structure du ligand synthétique de PPAR δ/β , le GW501516

spécificité des ligands. Il a été démontré que PPAR α manifeste une préférence pour les acides gras à longues chaînes insaturées comme les acides linoléique, linolénique et arachidonique à des concentrations comparables à celles retrouvées dans la circulation sanguine. Des dérivés de l'acide arachidonique tels que les médiateurs inflammatoires (le leukotriène B4 (LTB4) et l'acide 8-S hydroxy-eicosatétraénoïque (8-S-HETE)) ont aussi été identifiés comme des ligands à forte affinité pour le PPAR α (Michalick *et al.*, 1999).

Dans le cas de PPAR γ , celui-ci est activé par des acides gras insaturés et des métabolites de l'acide arachidonique dérivés de la voie de la cycloxygénase, les acides 9 et 13 hydroxydécanoïques (HODE). Le 15d-PGJ2 (15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2), un métabolite de la prostaglandine D2 (PGD2) (Figure I 17) (Takano *et al.*, 2002) agit comme ligand des PPAR γ , avec une affinité variant de 325 nM à 250 nM. Deux autres molécules endogènes ont aussi été décrites comme des ligands de PPAR γ : l'acide lysophosphatidique (LPA) et l'acide 8-S hydroxyéicosatétraénoïque (8-S-HETE) (Ziouzenkova *et al.*, 2004).

Il a été récemment découvert qu'en plus d'une fonction de senseur aux lipides, le PPAR β/δ serait également un senseur aux VLDL dans les macrophages (Barish, 2004). Les ligands naturels des PPAR β/δ ne sont par contre que très peu connus. Des acides gras polyinsaturés 18:2, 18:3 et 20:4 (Michalick *et al.*, 1999), ainsi que la prostacycline sont perçus comme ligands putatifs pour les PPAR β/δ . La prostacycline est produite par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses en réponse aux cytokines comme le TNF α (Puddu *et al.*, 2003).

3.2. Ligands Synthétiques des PPARs

Différents médicaments issus de la recherche pharmaceutique sont connus pour leur capacité à lier et à activer les PPARs : les médicaments hypolipidémiants, certains anti-inflammatoires et les molécules sensibilisantes à l'insuline (Puddu *et al.*, 2003).

Les ligands synthétiques de l'isotype α des PPARs sont des molécules de la classe des fibrates (comme le Fénofibrate, le Benzafibrate,...) - qui sont utilisées en thérapie comme agents hypolipidémiants dans le traitement de l'hypercholestérolémie - et de la classe des NSAIDs (Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs) comprenant l'Indométhacine et l'Ibuprofène (Puddu *et al.*, 2003).

Les PPAR γ possèdent de nombreux ligands synthétiques, dont les thiazolidinediones (TZD ou Glitazones) qui forment une classe de molécules antidiabétiques comprenant entre autres la troglitazone, la ciglitazone, la rosiglitazone et la pioglitazone (Takano *et al.*, 2002 et Vosper *et al.*, 2002).

Le L165041, un dérivé des acides phénoxyacétiques, a été reconnu comme le premier ligand synthétique des PPAR β/δ (Michalick *et al.*, 1999 et Puddu *et al.*, 2003). D'autres molécules pharmacologiques, dont le GW501516 (Figure I 18), la carbaprostacycline, un analogue de la prostacycline et le composé F sont des agonistes spécifiques du PPAR β/δ (Puddu *et al.*, 2003 et Duval *et al.*, 2002).

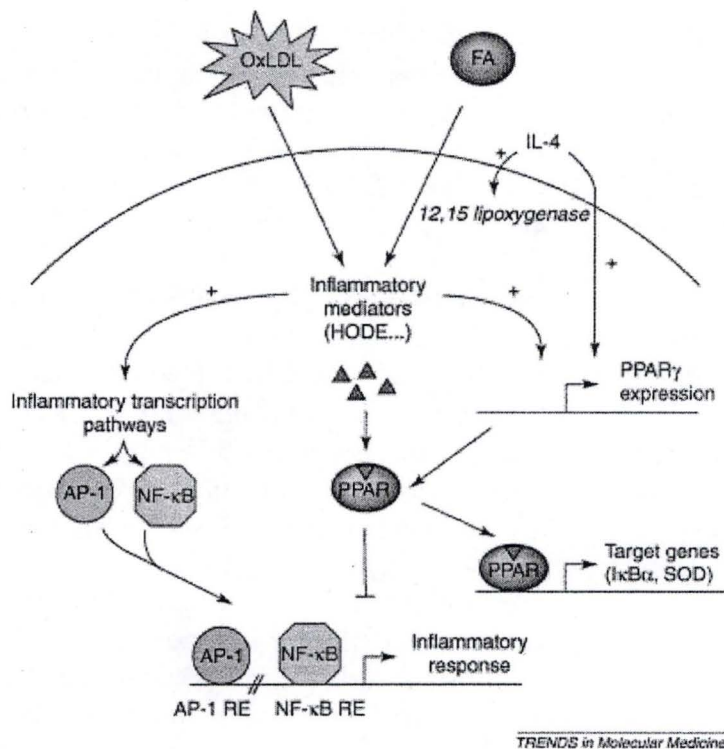


Figure I 19 : Les ligands des PPARs et leurs interactions décrites avec d'autres voies de transduction du signal. Les PPARs peuvent agir comme des facteurs de transcription ou comme des inhibiteurs de facteurs de transcription (AP-1 et NF-κB) (Duval *et al.* 2002).

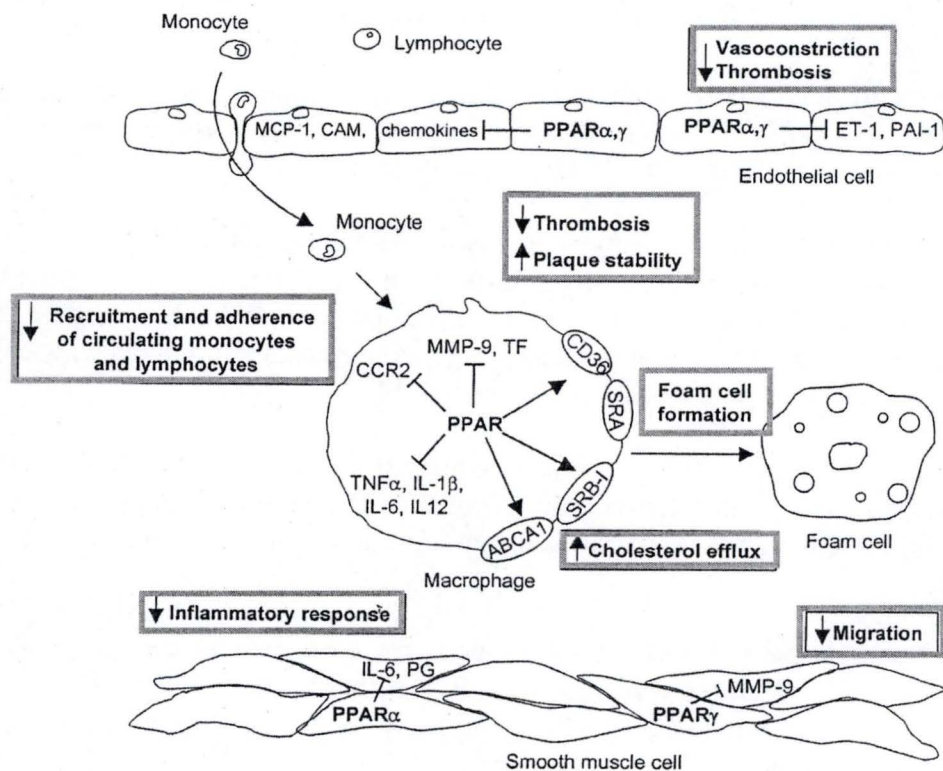


Figure I 20 : Schéma reprenant les différents rôles plutôt protecteurs des PPARs dans l'athérosclérose (Duez *et al.*, 2001)

4. Mécanismes d'action des PPARs

Les PPARs sont des facteurs de transcription ligand-dépendants. Une fois activés par leur ligand, ils hétérodimérisent avec le récepteur rétinolique X (RXR) et activent la transcription de gènes cibles comprenant un PPRE (PPAR Response Element) localisé dans leur région régulatrice (Figure I 19). Comme le récepteur est un dimère, deux répétitions de la séquence consensus sont nécessaires pour constituer un PPRE fonctionnel (Lemberger *et al.*, 1996). L'orientation relative (répétitions directes, configurations palindromiques ou palindromiques inversées) et l'espacement entre les deux séquences consensus ont aussi de l'importance. Dans le cas des PPAR-RXR, la séquence préférentiellement reconnue est une répétition directe de AGGTCA espacée d'une ou deux bases (Bishop-Bailey *et al.*, 2003 et Delerive *et al.*, 2001). Trois isotypes de RXR sont connus : α , β et γ (Brabender *et al.*, 2004), chacun dimérisant de manière spécifique avec un isotype de PPAR. Les combinaisons les plus efficaces sont pour PPAR α avec les RXR α ou γ , pour PPAR γ 1 avec RXR α et le PPAR γ 2 peut dimériser avec les trois isotypes de RXR (Schachtrup *et al.*, 2004). La spécificité du PPAR pour son PPRE est due à la reconnaissance de bases en amont de la séquence consensus des PPARs. Le PPRE du PPAR α est caractérisé par une séquence consensus 5'-C(C/G)(A/G)A(A/T)(C/T)-3' (Neve *et al.*, 2000).

5. Rôle particulier des PPARs dans l'athérosclérose

Les effets des PPARs sont fort divers. Ils peuvent jouer un rôle dans la vasoconstriction, dans le recrutement des leucocytes, dans la formation des cellules spumeuses et dans le transport du cholestérol, dans la réponse inflammatoire, mais aussi dans la formation et la stabilité de la plaque fibreuse (Figure I 20).

5.1. PPARs et vasoconstriction

Dans l'athérosclérose, l'endothélium est affaibli, ce qui induit une augmentation de l'adhérence des leucocytes. Une fois activées, les cellules endothéliales vont produire de l'endothéline-1 (ET-1), qui provoque la constriction des cellules musculaires lisses et est donc un puissant agent vasoconstricteur.

Les activateurs des PPAR α et PPAR γ répriment l'expression de la thrombine et de l'ET-1 en interagissant négativement avec la voie d'AP-1 dans les cellules endothéliales ce qui est plutôt favorable dans le contexte de l'athérosclérose (Marx, 2001) (figure I 21 et 22).

5.2. PPARs et équilibre anti-/ pro-thrombogène

L'équilibre anti-/prothrombogène repose à la fois sur l'équilibre entre les voies pro- et anti-coagulantes et sur la régulation de la fibrinolyse, régulée par la plasmine.

Les agonistes des PPAR α et PPAR γ répriment l'expression de la thrombine, agent causal majeur de la coagulation, dans les cellules endothéliales. Comme pour l'ET-1, cette répression s'expliquerait par l'interaction négative entre les PPARs et le facteur AP-1 (Duez *et al.*, 2001). Les agonistes de PPAR α inhibent directement l'expression du TF (Tissue

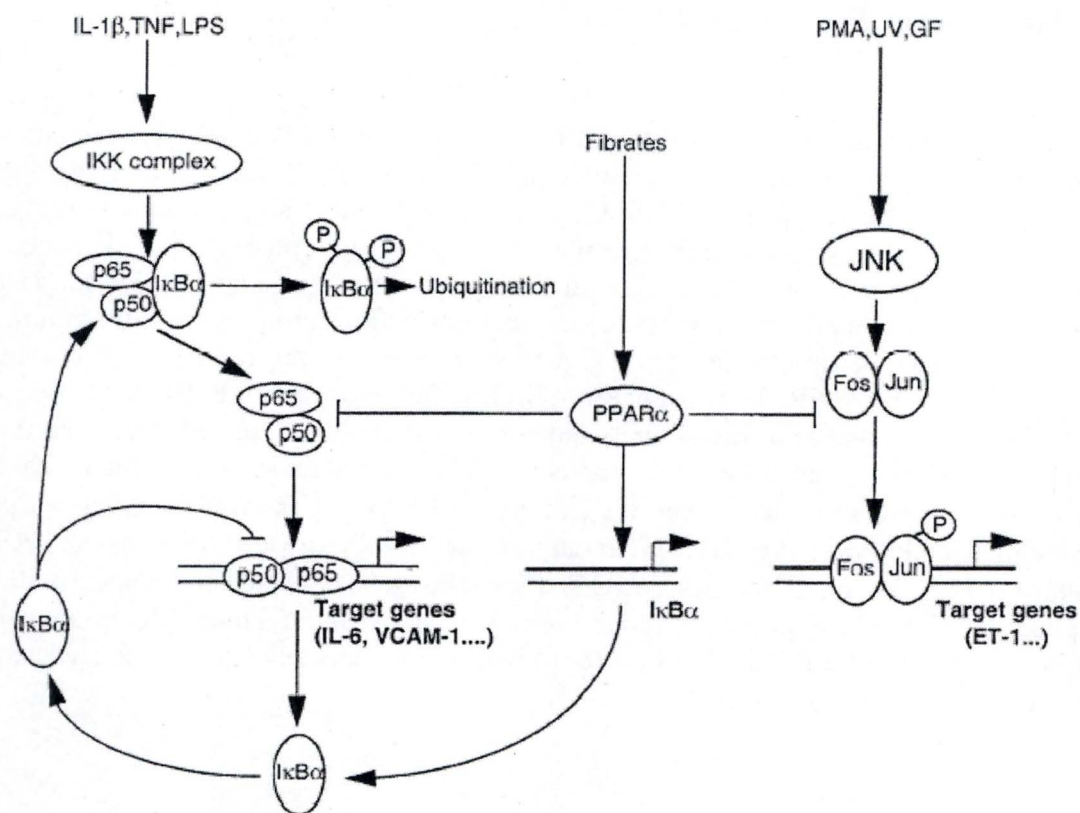


Figure I 21 : Interactions négatives de PPARα avec les voies de signalisation de NF-κB et de AP-1 (Delerive et al., 2001)

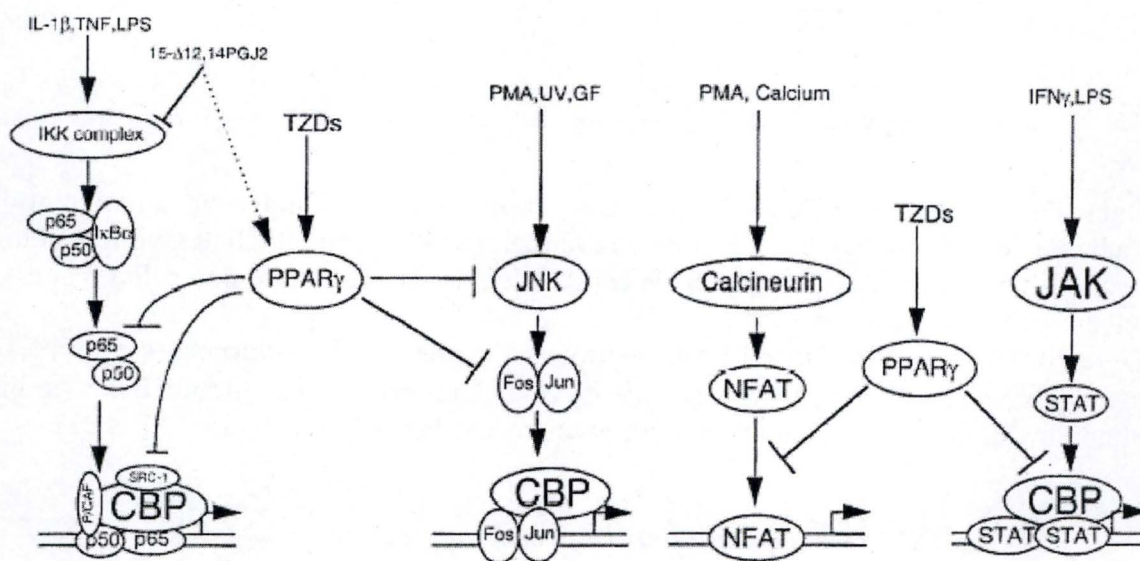


Figure I 22 : Interactions négatives de PPARγ avec les voies de signalisation de NF-κB, AP-1, STAT et NFAT (Delerive et al., 2001)

Factor) chez les monocytes, ce qui constitue de nouveau un mécanisme anti-coagulant vu que le TF active la voie extrinsèque de la coagulation. Les données de la littérature suggèrent également que les PPAR α et PPAR γ pourraient moduler l'expression du PAI-1 (ou Plasminogen Activators type-1). Des taux élevés de PAI-1 sont associés à la thrombose et à l'infarctus du myocarde. Pour rappel, le PAI-1 empêche l'activation du plasminogène et freine donc la fibrinolyse. Chez les patients diabétiques (de type 2), la troglitazone, ligand de PPAR γ , réduit les taux plasmatiques de PAI-1. Cette molécule, ainsi que la pioglitazone, diminue également l'expression de PAI-1, chez des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) en culture. Ces données suggèrent plutôt un effet bénéfique des PPARs. Malheureusement, d'autres ligands, tels certains fibrates, induiraient l'expression du PAI-1. Le rôle exact des PPARs dans la régulation du PAI-1 reste à établir. Globalement, il semble que les PPARs soient plutôt anti-thrombogènes (pour revue voir Duez *et al.*, 2001 et Vosper *et al.*, 2002).

5.3. PPARs et recrutement des leucocytes

Le processus de formation de la plaque athérosclérotique implique le recrutement des monocytes circulants, qui doivent d'abord adhérer à l'endothélium avant d'entrer dans l'intima des vaisseaux sanguins où ils se différencient en macrophages. L'activation des PPARs semble jouer un rôle à différents niveaux lors de ces processus. Le recrutement des monocytes par les cellules endothéliales se fait, entre autres, grâce à la protéine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) et son récepteur CCR2.

Des études ont montré que l'activation des PPAR γ inhibe l'expression des récepteurs CCR2 et empêche de la sorte le chimotactisme médié par MCP-1 (Han et Quenhenberge, 2000). Par ailleurs, d'autres étapes du recrutement des monocytes peuvent être inhibées en diminuant l'expression de l'interféron- γ (IFN γ) et celle de l'interleukine-8 (IL-8) dans les cellules endothéliales via PPAR γ (Duval *et al.*, 2002).

Une fois recrutés, le rolling et l'adhérence de ceux-ci sont aussi des étapes critiques précoces de l'athérosclérose, faisant intervenir des molécules d'adhérence telles que VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) et ICAM-1 (Intracellular Cell Adhesion Molecule), les E-sélectines et les P-sélectines (figure I 20). Il a été démontré que l'induction de VCAM-1 par le TNF- α dans les cellules endothéliales est inhibée par les activateurs de PPAR α (Vosper *et al.*, 2002).

5.4. PPARs et réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire nécessite une multitude de voies de signalisation qui agissent de concert pour former les médiateurs inflammatoires. L'iCOX2 (Inducible Cyclooxygenase 2) est un des régulateurs clés de la réponse inflammatoire qui catalyse la production de prostanoïdes, effecteurs majeurs de la réponse inflammatoire. L'iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase) est un autre médiateur clé des voies de signalisation, particulièrement dans l'explosion respiratoire du macrophage et la génération de ROS (Reactive Oxygen Species). Chacune de ces deux enzymes (iNOS et iCOX2) peut être induite par la cytokine interleukine-1 β (IL-1 β). Cette induction est bloquée par les agonistes du PPAR α en interférant avec le

facteur NF- κ B. (Vosper *et al.*, 2002 ; Jiang *et al.*, 1998). Les ligands de PPAR γ inhibent également la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6,... Il faut signaler cependant que les effets anti-inflammatoires pourraient s'exercer via des mécanismes PPAR γ dépendants et indépendants (pour revue voir Barbier *et al.*, 2002). Mais certains agonistes de PPAR, favorisent l'expression de la II-sPLA2 (secreted phospholipase A2), impliquée dans la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (éicosanoïdes, acide lysophosphatidique,...). Les agonistes de PPAR α inhibent également l'expression du récepteur au PAF, chez les macrophages. Le PAF (ou Platelet activating factor) est un puissant médiateur lipidique de l'inflammation (pour revue voir Vosper *et al.*, 2002). On constate par ailleurs que les patients traités avec des fibrates (ligands de PPAR α) ou avec des TZD (ligands de PPAR γ), ont des taux plasmatiques d'IL-6 et de CRP (C-Reactive Protein) plus bas. Tous ces effets anti-inflammatoires s'expliqueraient par des interactions négatives avec d'autres facteurs de transcription et en particulier les facteurs NF- κ B, AP-1 et STAT (figure I 21 et 22).

5.5. PPARs dans la formation des cellules spumeuses et dans le transport du cholestérol

Les cellules spumeuses sont issues de lignées myocytaires et monocytaires. Les monocytes, une fois infiltrés dans l'intima, se différencient en macrophages et accumulent des lipoprotéines modifiées par oxydation ou glycosylation. L'anion superoxyde et les ROS (Reactive Oxygen Species) permettent l'oxydation des LDL en LDL oxydées. Les ligands des PPAR α et γ augmentent l'expression de la CuZn SOD (CuZn Superoxide Dismutase), ce qui contribue à l'augmentation des LDL oxydés (Duval *et al.*, 2002), et donc à l'augmentation de la formation de cellules spumeuses, ce qui est athérogène (figure I 20).

Les récepteurs scavenger-A (SR-A) permettent l'internalisation des LDL oxydées par les macrophages et ainsi la formation des cellules spumeuses (Nicholson, 2004). L'expression de ce récepteur peut être inhibée par les agonistes des PPAR α et γ (Duez *et al.*, 2001). Par contre, CD36, un autre récepteur scavenger, sous le contrôle de PPAR γ , voit son expression augmenter lors de l'activation de PPAR γ (Barish *et al.*, 2004), ce qui est en opposition avec l'effet des PPAR α sur SR-A. Les récepteurs CD36 et SR-A sont donc régulés de manière opposée par les PPAR α et γ (Duval *et al.*, 2002).

Les PPARs régulent aussi l'homéostasie du cholestérol au niveau des macrophages. Les activateurs des PPAR α et des PPAR γ induisent l'expression des récepteurs CLA-1/SRB-1 (Scavenger Receptor B-1) et ABCA-1 (ATP Binding Cassette transporter A-1) (Duval *et al.*, 2002). Ces deux protéines membranaires ont pour rôle de favoriser l'efflux du cholestérol hors des macrophages, ce qui diminuerait le nombre de cellules spumeuses jouant un rôle dans la formation de la plaque d'athérosclérose (Torra *et al.*, 2001) (figure I 20). Les agonistes de PPAR α induisent également l'expression des ApoA-I et ApoA-II, les deux apoprotéines majeures des HDL (high density lipoprotein), ce qui favorise la production des HDL (ou bon cholestérol), effet anti-athérogène reconnu.

Les rôles des PPARs sont donc controversés. L'hypothèse de leur rôle pro-inflammatoire est soutenue par les observations que les PPARs induisent la formation de cellules spumeuses par l'augmentation de l'expression de CD36 et l'hypothèse anti-inflammatoire sur base de

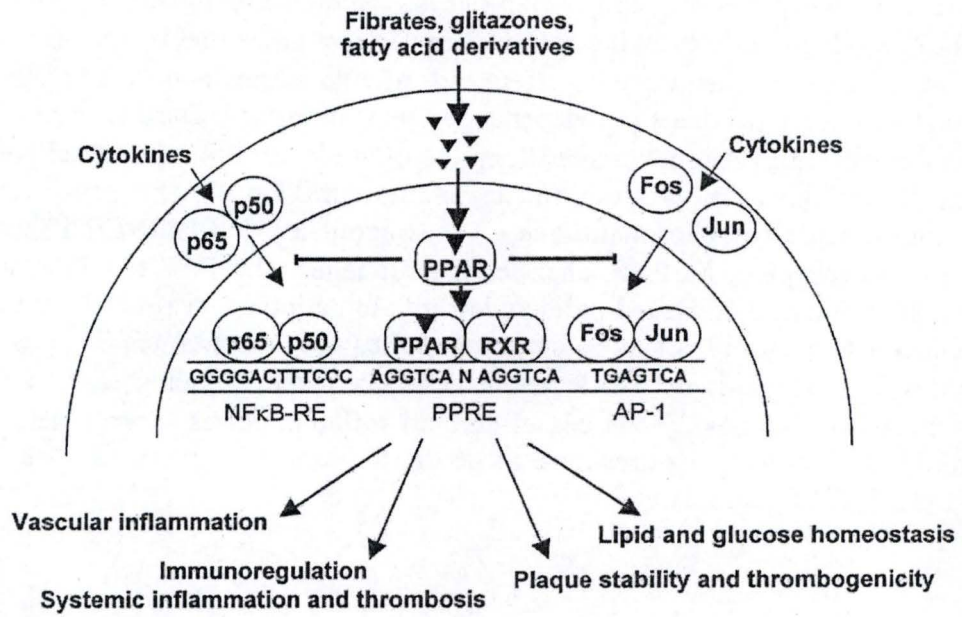


Figure I 23 : Les effets des ligands des PPARs sur les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB
(Duez *et al.*, 2001)

l'action des PPARs dans l'efflux du cholestérol hors des macrophages grâce à l'augmentation de l'expression des divers transporteurs au cholestérol.

5.6. Rôle des PPARs dans le développement de la chape fibreuse et dans la stabilité de la plaque athéromateuse

Au fur et à mesure que les lésions s'installent, les cellules musculaires lisses (CML) prolifèrent et produisent des composants de la MEC (Matrice ExtraCellulaire), ce qui mène à la formation de la chape fibreuse. Les ligands des PPARs inhibent la prolifération et la migration des CML vasculaires par l'inhibition de l'expression de Ets-1, un facteur de transcription requis pour l'induction de métalloprotéases matricielles (dont la MMP-9). D'autre part, les ligands de PPAR γ inhibent l'expression d'ATR-1 (Angiotensin II Type 1 Receptor), ce qui contribuerait aussi à l'inhibition de la migration des CML et du développement de la chape fibreuse (Duval *et al.*, 2002) (figure I 20).

La rupture de la plaque est le stade final de l'athérogenèse, menant à la formation du thrombus, l'occlusion du vaisseau sanguin et les signes cliniques de la maladie. La rupture de la plaque est lié en partie à la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau de la plaque fibreuse et dépend en partie de l'activité d'une protéase sécrétée : la MMP-9 (Matrix Metallo Protease-9) ou gélatinase B produite par les macrophages (Marx *et al.*, 1998). Les ligands des PPAR α et des PPAR γ répriment la transcription du gène codant pour la MMP-9. Ceci suggère que les PPARs peuvent moduler la balance de la production-dégradation de la MEC (Matrice Extracellulaire) par les macrophages, ce qui peut dans une certaine mesure ralentir la progression de la plaque d'athérosclérose (Duval *et al.*, 2002).

5.7. Rôle particulier des PPARs chez les monocytes-macrophages

Comme illustré dans les paragraphes précédents, les PPARs exercent des effets pro- ainsi qu'anti-inflammatoires (Figure I 19 et Figure I 23), bien que la majorité des effets des PPARs sur les cellules impliquées dans l'athérosclérose soit plutôt bénéfique dans ce contexte (Figure I 24).

On retrouve cette même ambiguïté quant aux effets des agonistes des PPARs, lorsqu'on se focalise sur la lignée monocyttaire.

Les PPAR α sont exprimés dans les monocytes humains, les PPAR γ et β/δ ne sont pas exprimés dans ces cellules, on les trouve une fois la différenciation en macrophages opérée (Duval *et al.*, 2002).

Les PPARs sont connus comme des régulateurs de la réponse inflammatoire des monocytes-macrophages grâce à leur interaction avec les voies de signalisation tel que NF- κ B et AP-1.

Ceux-ci sont aussi connus comme les promoteurs de la différenciation des monocytes en macrophages, de l'assimilation des lipides et de l'apoptose des macrophages (Tontonoz *et al.*, 1998, Vosper *et al.*, 2001, Chinetti *et al.*, 1998 et Chawla *et al.*, 2001).

La formation des cellules spumeuses à partir de macrophages dans la paroi cellulaire est caractérisée par des changements radicaux dans le métabolisme des lipides, incluant l'augmentation de l'expression des récepteurs scavenger et l'augmentation de l'assimilation des LDL oxydés. Il a été démontré que le PPAR γ est induit dans les monocytes humains après exposition aux LDL oxydés et qu'il est fortement exprimé dans les cellules spumeuses

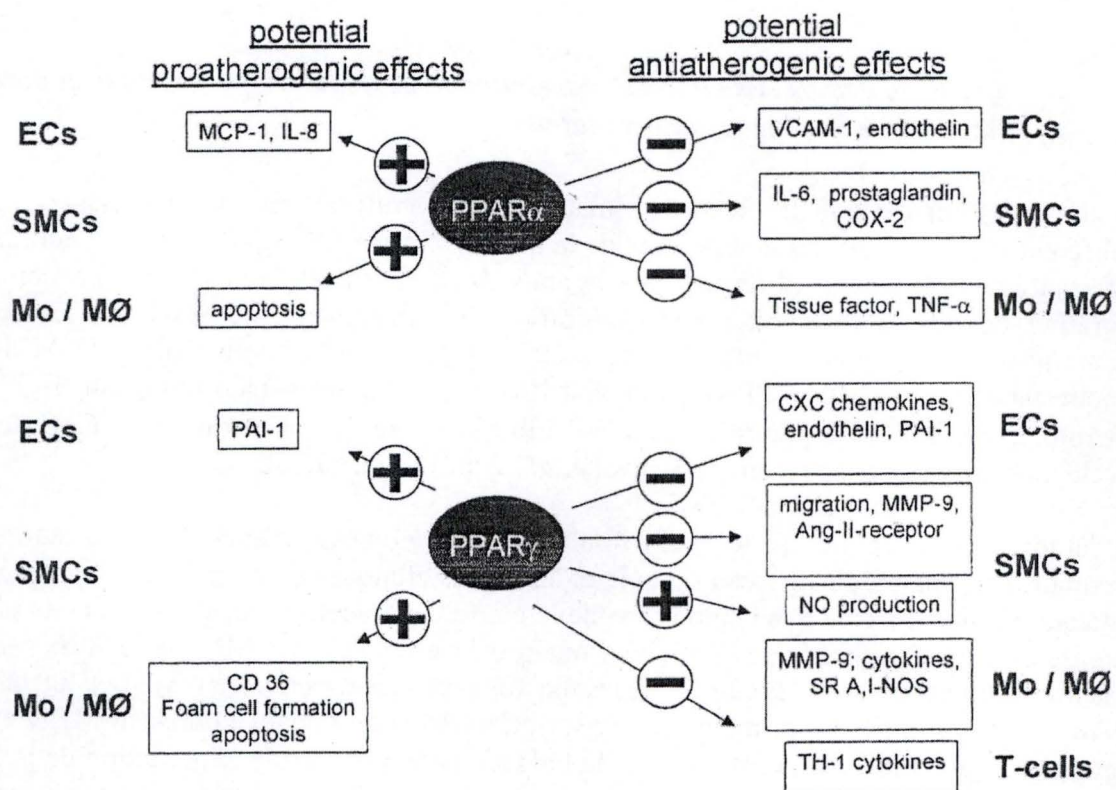


Figure I 24 : Les effets pro- et anti-athérogènes potentiels des PPARα et γ. Les effets de répression sont représentés par – alors que les inductions médiées par les PPARα ou γ sont représentées par + (Marx, 2001)

au niveau des lésions athérosclérotiques (Tontonoz *et al.*, 1998). Les PPAR α et γ induisent également l'apoptose des macrophages stimulés avec une combinaison d'IFN γ et de TNF- α .

Ce phénomène d'apoptose des macrophages peut participer à la formation du core nécrotique au sein des lésions athérosclérotiques et donc favoriser la formation des lésions athérosclérotiques (Marx *et al.*, 2001).

A côté de ces rôles plutôt pro-athérogéniques, il faut souligner des fonctions protectrices : les PPARs activés favorisent l'efflux du cholestérol des cellules macrophagiques, ce qui diminuerait le nombre de cellules spumeuses (voir paragraphe 5.5). Rappelons également que le récepteur scavenger SR-A, contrairement au CD36, est régulé négativement par les agonistes des PPAR γ (figure I 24).

En résumé malgré certains effets négatifs des PPARs α et γ dans le contexte de l'athérosclérose, les diverses actions des PPARs dans les étapes précoces de l'athérosclérose seraient plutôt bénéfiques. Il n'en demeure pas moins que le sujet reste controversé dans la littérature, les effets obtenus dépendent très certainement des isotypes de PPARs et du contexte cellulaire dans lequel ils se trouvent. De plus, les effets des agonistes des PPARs sont particulièrement diversifiés étant donné que les PPARs activés peuvent fonctionner à la fois comme facteurs de transcription et comme co-répresseurs pour plusieurs facteurs de transcription particulièrement importants tels que NF- κ B, AP-1 ou STAT (figure I 22-24).

III. Objectifs

L'objectif de ce mémoire consiste en l'étude des effets potentiellement anti-inflammatoires des PPARs sur les monocytes THP-1 différenciés en macrophages et stimulés au LPS.

Dans le cadre de la validation de la DualChip Human General (EAT), Vanessa Suin (2003) avait montré la surexpression de plusieurs gènes en condition de stimulation au LPS par rapport à la situation contrôle.

Nous avons donc repris les gènes surexprimés en présence de LPS mis en évidence par Vanessa Suin (2003), puisqu'ils encodent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α), une protéine d'adhérence impliquée dans la diapédèse (ICAM-1), une enzyme antioxydante (SOD 2), une protéine anticoagulante (THBD ou Thrombomoduline). Mais nous avons élargi cette liste incluant des gènes encodant des protéines impliquées dans le recrutement et la transmigration leucocytaires (MCP-1, uPAR et Plau), des marqueurs pour la différenciation en macrophages (CD36, en récepteur scavenger pour les lipoprotéines modifiées), des marqueurs de l'inflammation (la cytokine IL-6 et l'enzyme inductible COX-2 ou Cyclooxygénase 2, à la base de la synthèse des prostaglandines) et des facteurs de croissance, produits par les monocytes activés par le LPS (IGFBP3).

Dans notre travail, nous allons dans un premier temps vérifier si la réponse inflammatoire LPS-dépendante est la même chez pour les THP-1 différenciés en macrophages et ensuite voir si le système PPAR peut modifier les profil d'expression LPS-dépendant et donc exercer des effets anti-inflammatoires dans ce modèle. Les différences d'expression génique seront analysées par la méthode de PCR en temps réel. Nous avons choisi de travailler sur des macrophages plutôt que sur des monocytes, étant donné que les PPARs sont très peu exprimés, et en particulier le PPAR γ dans les monocytes et apparaissent lors de l'étape de différenciation en macrophages.

Dans un second temps nous avons saisi l'opportunité d'étendre notre étude, par l'utilisation d'un damier à ADN.

L'Adipo-Athéro-chip mise au point au laboratoire par l'équipe du Dr. Thierry Arnould en collaboration avec l'équipe du Pr. Martine Raes dans le cadre du réseau PAI (Pôle d'Attraction Inter-universitaire), est un damier en modèle murin utilisé pour suivre les variations d'expression génique au cours de l'adipogenèse in vitro ou dans du tissu adipeux de souris double-Knot out (DKO) traités ou non dans le contexte de l'athérosclérose. Le damier porte 89 sondes de captures ciblant des gènes encodant des facteurs hormonaux ou de croissance, des cytokines, des facteurs de transcription, des récepteurs et des transporteurs membranaires,... mais en relation avec le métabolisme lipidique et glucidique, la différenciation adipocytaire et l'inflammation. Certains de ces gènes semblaient donc des cibles bien choisies dans le cadre de ce travail.

De cet fait, un changement de modèle cellulaire a été nécessaire et notre choix s'est porté sur la lignée cellulaire de macrophages murins connus sous le nom de J 774.1.

Nous espérons avec ce travail apporter des informations quant au rôle potentiellement anti-inflammatoire des PPARs sur une réponse LPS-dépendante dans les modèles cellulaires de macrophages utilisés.

Matériel et Méthodes

	Réactif	Concentration finale	Source
<i>RPMI base</i>	RPMI 1640	-	Gibco BRL
	Hepes	10 mM	Acros Organics
	Pyruvate	1 mM	Sigma
	Glucose	2,5 g/l	Merck
	β -mercaptoéthanol	0,05 mM	Fluka
<i>RPMI complet</i>	RPMI base	90 %	-
	FBS (Fetal Bovine Serum)	10 %	Gibco BRL
<i>RPMI stimulation</i>	RPMI base	99,5 %	
	FBS	0,5 %	Gibco BRL

Tableau II 1 : Tableau reprenant la composition des milieux de culture utilisés

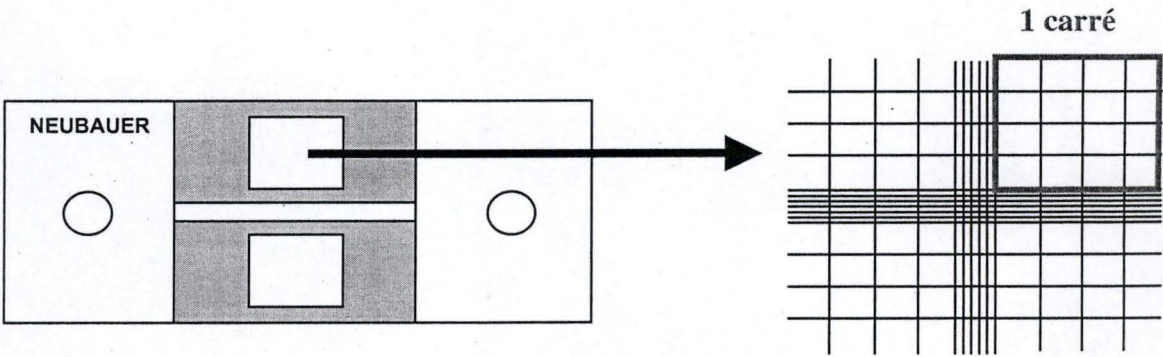


Figure II 1: Schéma d'une chambre de Neubauer avec zoom sur la zone de comptage

I. Culture cellulaire des monocytes THP-1

Les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 sont issues du sang périphérique d'un jeune garçon d'un an touché par une leucémie monocyttaire aiguë. Ces cellules se multiplient en suspension en formant des grappes. Elles sont facilement différenciables en macrophages, ce qui explique leur utilisation fréquente dans le cadre de nombreux travaux réalisés dans le contexte de l'athérosclérose.

Matériels

- * RPMI complet (Tableau II 1)
- * Pipettes de 10 ml et de 5 ml stériles (Starstedt)
- * Tubes de 10 ml (Becton Dickinson)
- * Boîtes de cultures T75 (75cm²) (Costar)
- * Bleu Trypan (Sigma)
- * Chambre de Neubauer (Marienfield)
- * Centrifugeuse (Heraeus Sepatech)
- * Étuve à 37°C / 5 % de CO₂ (Heraeus Sepatech)
- * Microscope inversé (Leica)

Méthode

La culture des monocytes THP-1 se réalise sous une hotte à flux laminaire vertical préalablement nettoyée à l'alcool. Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture RPMI complet (15 ml) jusqu'à une densité maximale de 7.10^5 cellules/ml à laquelle elles sont repiquées à raison de 2.10^5 cellules / ml. Lors du repiquage, trois fois par semaine, les 15 ml de milieu contenant les cellules sont répartis de manière égale dans deux tubes de 10 ml et ensuite centrifugés à 1000 rpm durant 7 minutes. Après la centrifugation, le surnageant est décanté et le culot est resuspendu à raison de 3.10^6 par ml (*) dans du RPMI complet préalablement chauffé à 37°C. Dans une nouvelle boîte de culture T75, on ajoute 1 ml de suspension cellulaire à 14 ml de milieu complet. Les cellules sont alors incubées dans une étuve à 37°C / 5 % de CO₂.

(*) Comptage des cellules

Avant la centrifugation, 100 µl de suspension cellulaire sont mélangés à 100 µl de bleu de Trypan qui colore en bleu le cytoplasme des cellules mortes. Ce mélange est alors déposé par capillarité dans la chambre de Neubauer (Figure II 1). Celle-ci comporte un quadrillage de huit grands carrés qui permettent un comptage facile des cellules.

Le nombre total de cellules se calcule en multipliant le résultat de la formule suivante par 15 (nombre de ml par T75).

$$\text{Nombre de cellules par ml} : \frac{\text{Nombre de cellules comptées dans les 8 carrés} \times 10000 \times 2}{8}$$

10000 : facteur volumétrique (0,1 µl par carré)

2 : dilution 2 fois (100 µl de suspension cellulaire + 100 µl de bleu de Trypan)

8 : pour ramener le nombre de cellules à un carré (= moyenne)

II. Différenciation des cellules THP-1 en macrophages

Matériels

- * Boîtes de culture T75 (Costar)
- * PMA (Phorbol Myristate acétate) (Sigma)
- * RPMI complet (Tableau II 1)
- * Tips autoclavés (Greiner bio-one)
- * Étuve à 37°C / 5% CO₂ (Heraeus Sepatech)
- * Microscope inversé (Leica)

Méthode

Les cellules sont repiquées à une densité de 9.10^6 de cellules dans 10 ml de RPMI complet. La différenciation des monocytes THP-1 en macrophages s'effectue par l'ajout de PMA à une concentration finale de 0,6 μ M.

Les cellules sont ensuite incubées durant 24 heures à 37°C / 5% CO₂. Durant la différenciation, le phénotype des cellules THP-1 en suspension change : les THP-1 différenciées deviennent adhérentes et étalées.

III. Culture cellulaire de macrophages murins J774.1

Les cellules J774.1 sont des macrophages murins issus d'une souris femelle BALB/c. Ces cellules se multiplient en formant des îlots cellulaires adhérents. Elles sont morphologiquement étalées et présentent des vacuoles cytoplasmiques.

Matériels

- * Boîtes de culture T75 (Costar)
- * RPMI complet (Tableau II 1)
- * Pipettes stériles de 10 et de 5 ml (Starstedt)
- * Râteaux stériles (Dispenser)
- * Étuve à 37°C / 5 % de CO₂ (Heraeus Sepatech)
- * Microscope inversé (Leica)

Méthode

La culture des cellules J774.1 se réalise dans un milieu stérile, sous hotte à flux laminaire vertical, préalablement nettoyée à l'alcool.

Lorsqu'elles sont à confluence (environ 5.10^6 cellules dans une T75), les cellules sont détachées à l'aide d'un râteau : 2,5 ml de suspension cellulaire sont dilués dans 12,5 ml de milieu RPMI complet frais préalablement préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C / 5 % de CO₂. Le repiquage est effectué 2 fois par semaine.

IV. Stimulation des macrophages

Matériels

- * RPMI stimulation (Tableau II 1)
- * Microscope inversé (Leica)
- * Étuve à 37°C / 5 % CO₂ (Heraeus Sepatech)
- * Tips stériles (Greiner bio-one)
- * Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma)

	CTL	LPS	RO	GW	PGJ2
<i>Cc stock de la solution</i>	/	2 mg/ml	10 nM	1 mM	3 µM
<i>Pré-incubation 1h</i>	/	/	Oui	Oui	Oui
<i>Stimulation 6h</i>	/	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Cc finale</i>	/	0,1 µg/ml	2 et 50 µM	2 nM	6 µM

Tableau II 2 : Conditions de stimulations des macrophages (CTL : contrôle, LPS : Lipopolysaccharide, RO : Roziglitazone, GW : GW501516, PGJ2 : 15d-PGJ(2))

Produits	Concentrations	Source
NaF	10 mM	Merck
Na ₂ MoO ₄	2 mM	Sigma
Hepes	40 mM	Accros Organics
EDTA	0,2 mM	Merck

Tableau II 3 : Composition de l'Hypotonic Buffer 2x (HB 2X)

Produits	Quantité	Source
HB 2X	10 ml	-
Nonidet P-40 10%	400 µl	Sigma
Eau Milli-Q	9,6 ml	MilliPore

Tableau II 4 : Composition de la Solution de lyse (20 ml)

Produits	Quantité	Source
HB 2X	10 ml	-
Glycérol 87 %	4 ml	Merck
Eau Milli-Q	6 ml	MilliPore

Tableau II 5 : Composition du tampon RE (Resuspension Buffer) (20

Produits	Quantité	Source
HB 2X	10 ml	-
Glycérol 87 %	4 ml	Merck
NaCl 4 M	4 ml	Merck
Eau Milli-Q	2 ml	MilliPore

Tableau II 6: Composition du tampon SA (Saline Buffer) (20 ml)

Produits	Concentration finale	Source
NaVO ₃	25 mM	Sigma
PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate)	250 mM	Sigma
β-glycérol phosphate	250 mM	Sigma
NaF	125 mM	Merck

Tableau II 7 : Composition du PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)

Produits	Quantité	Source
RE	1 ml	-
SA	1 ml	-
PIC	80 µl	Roche
PIB	80 µl	-
DTT 1M	2 µl	Sigma

Tableau II 8 : Composition du tampon de lyse

Produits	Concentration finale	Source
NaCl	24 mM	Merck
Hepes	6 mM – pH 7,9	Accros Organics
EDTA	0,6 mM	Merck
Glycérol	36 %	Merck

Tableau II 9 : Composition du concentré de tampon de liaison AP-1 (concentré 3X)

Produits	Quantité	Source
Tampon de liaison AP-1 3x	800 µl	-
Eau Milli-Q	1590 µl	MilliPore
Poly dI-dC 0,05 µg/µl	8 µl	Roche
Gloria 10 %	24 µl	Nestlé
DTT 1 M	2,4 µl	Sigma

Tableau II 10 : Composition du tampon de liaison AP-1 (concentré 1X)

Méthode

Dans un premier temps, le milieu de culture (RPMI complet) est remplacé par 10 ml de RPMI stimulation. Une fois le milieu changé, les cellules sont mises au repos durant une heure à 37°C / 5 % CO₂.

Lors de l'utilisation d'agonistes des PPARs, une pré-incubation durant l'heure de repos est réalisée avec l'agoniste à une concentration équivalente à la moitié de celle utilisée pour la stimulation. Les cellules sont ensuite stimulées pendant 6 heures avec le LPS en présence ou non de l'agoniste (Tableau II 2).

V. Dosage colorimétrique de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1

Matériels

Extraction de protéines nucléaires

- * PBS (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 – NaCl 150 mM)
- * PBS Mo (PBS + 1 mM Na₂MoO₄ + 5 mM NaF)
- * HB 2X (Hypotonic Buffer concentré 2X) (Tableau II 3)
- * Solution de lyse (Tableau II 4)
- * RE (Resuspension Buffer) (Tableau II 5)
- * SA (Saline Buffer) (Tableau II 6)
- * PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche)
- * PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) (Tableau II 7)
- * Racloirs (Dispenser)
- * Microtubes de 1,5 ml (Starstedt)

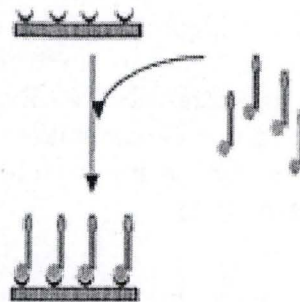
Bradford

- * BSA (Bovin Serum Albumin) (2 mg/ml) (Pierce)
- * Bio-Rad Protein Assay (Biorad)
- * Eau Milli-Q (Millipore)
- * Spectrophotomètre – Ultrospec 2100Pro (Biochrome)
- * Cuvette de quantification en quartz

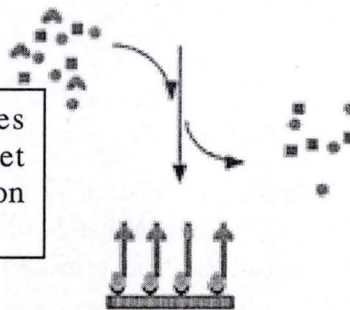
Détection de la liaison du facteur de transcription

- * Tampon de lyse (Tableau II 8)
- * Tampon de liaison AP-1 (Tableau II 9 et Tableau II 10)
- * Plaques multipuits contenant la séquence ADN de liaison pour AP-1
- * PBS 50 (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - NaCl 50 mM)
- * Tween 20 (Sigma)
- * BSA (Sigma)
- * Anticorps primaire monoclonal de lapin anti-cfos (Santa Cruz)
- * Anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (Santa Cruz)
- * Tetra-Methyl Benzidine (TMB) (Biosource)
- * Solution stop (H₂SO₄) (Biosource)
- * Lecteur de plaques multipuits Ultramark - Microplate Imaging System (Biorad)

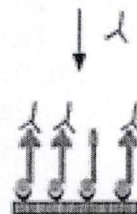
Etape 1 : Fixation de la séquence consensus d'AP-1 avec de la biotine dans les puits coatés à la streptavidine



Etape 2 : Dépôt des extraits nucléaires et lavage des protéines non fixées



Etape 3 : Incubation avec l'ac primaire anti-cFos



Etape 4 : Incubation avec l'ac secondaire dirigé contre l'ac primaire et couplé à une HRP

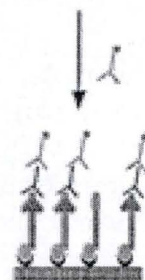


Figure II 2 : Représentation schématique du principe du dosage colorimétrique de l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription (Renard *et al.*, 2001)

Méthodes

Extraction de protéines nucléaires

Les cellules sont cultivées en T25. Après les 45 minutes de stimulation, le milieu est décanté et les cellules rincées 1X 1 minute avec 3 ml de PBS froid et 1X 1 minute avec du PBS Mo. On ajoute ensuite 3 ml de HB 1X (HB 2X dilué dans l'eau) et on incube 3 minutes à RT° avant de décanter. Les cellules sont raclées dans 200 µl de solution de lyse et les lysats cellulaires sont transférés dans un microtube et centrifugés 30 secondes à 13000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 30 µl de RE suivi de 30 µl de SA. Les tubes sont placés en chambre froide sur une roue durant minimum de 30 minutes. Les échantillons sont centrifugés à 13000 rpm 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont récoltés dans des microtubes et conservés à -70°C. 5 µl sont conservés pour le dosage protéique.

Dosage protéique par Bradford

Pour chaque échantillon, on dilue 2,5 µl (étalon - 5 µg - ou eau) ou 2 µl (échantillon ou blanc) de protéines nucléaires dans 1 ml de colorant de Bradford dilué 5X et filtré. Les mix sont incubés 5 minutes à RT° et l'absorbance à 595 nm est relevée de minute en minute. La concentration protéique des échantillons est déterminée d'après les valeurs d'absorbance mesurée pour l'étalon.

Détection de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription (Figure II 2)

Les extraits protéiques sont dilués dans le tampon de lyse à une concentration finale de 5 µg / 20 µl. Les 20 µl, ainsi que les 30 µl de tampon de liaison AP-1 sont déposés dans chaque puits. Pour les blancs, on ajoute 20 µl de tampon de lyse à la place des extraits protéiques. La plaque multipuits est recouverte d'un film plastique et incubée une heure à température ambiante sous légère agitation. Les puits sont ensuite lavés 3X 2 minutes avec 200 µl de PBS + tween 0,1%. L'anticorps primaire préalablement dilué 1000 X dans du PBS 50 + BSA 1% est distribué à raison de 100 µl par puits. La plaque est recouverte d'un film et incubée 1 heure à température ambiante. Une nouvelle série de lavages est réalisée comme suit : 3X 2 minutes avec 200 µl de PBS + tween 0,1%. L'anticorps secondaire est dilué 1000 X dans du PBS 50 + BSA 1% et distribué à raison de 100 µl par puits. La plaque est recouverte d'un film et incubée 1 heure à température ambiante et ensuite lavée 4X 2 minutes avec 200 µl de PBS + tween 0,1%. Pour la révélation, on distribue 100 µl de TMB par puits et on incube 10 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction de révélation est stoppée par ajout de 100 µl de solution stop dans chaque puits. L'absorbance est lue à 450 nm avec une référence à 655 nm.

VI. Extraction d'ARN total

Les extractions ont été réalisées avec les kits d'extraction d'ARN total « RiboPure™ Kit » d'Ambion pour les PCR en temps réel et « RNAgents » de Promega pour les hybridations sur damiers à ADN.

Matériels pour les 2 types d'extractions

- * SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (Merck)
- * Vortex (IKA)
- * Centrifugeuse (Heraeus Sepatech)
- * Tips à filtres "RNase free" (Greiner bio-one)
- * Gants "powder free" (Mölnlycke Health Care)
- * Râteaux stériles (Dispenser)
- * Microtubes (Starstedt)

RNAwiz	50 ml
Wash Solution 1	40 ml
Wash Solution 2/3 concentrate	16 ml
Elution Solution	10 ml
Filter cartridges	50 pièces
Collection tubes (2 ml)	100 pièces

Tableau II 11 : Composition du Kit RiboPure™

RNAagents® Denaturing Solution	120 ml
2M Sodium acétate (pH 4.0)	10 ml
Phenol:Chloroforme:Isoamyl Alcohol (99:24:1, pH 4.7) = P/C/I	100 ml
Isopropanol	100 ml

Tableau II 12 : Composition du Kit RNAagents®

Produit	Concentration finale	Source
NaCl	150 mM	Merck
Tampon phosphate - pH 7,4	10 mM	Merck
Eau Milli-Q	500 ml	Milli Pore

Tableau II 13 : Composition du PBS pour 500 ml

- * Spectrophotomètre, Ultrospec 2100Pro (Biochrome)
- * Cuvette de quantification pour spectrophotomètre 10 mm (Hellma)

Matériels pour l'extraction d'ARN total avec le kit « RiboPure™ »

- * Kit d'extraction d'ARN total « RiboPure™ Kit » (Ambion) (Tableau II 11)
- * Éthanol absolu (Merck)
- * Chloroforme (Merck)

L'extraction d'ARN total doit se faire en conditions *RNase free* pour éviter toute possibilité de dégradation de l'ARN. Le matériel ainsi que la paillasse de travail sont préalablement nettoyés avec du SDS 1%.

Protocole RiboPure (selon les instructions du fabricant)

Le protocole consiste à rompre les membranes cellulaires des échantillons dans le RNaWiz, qui contient du phénol et un réactif qui inactive les RNases endogènes.

Ensuite l'addition de chloroforme et la centrifugation ont pour effet de séparer les phases organiques (contenant les déchets protéiques et l'ADN génomique contaminant) et aqueuses (contenant l'ARN).

L'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité avec de l'éthanol absolu et filtré sur une spin-colonne du kit (filtre de silice).

L'ARN est lavé trois fois avec les solutions Wash 1, Wash 2 et 3 et ensuite, élué dans 100 µl de tampon d'éluion.

L'ARN total isolé est quantifié (#) et conservé à -80°C pour éviter sa dégradation.

Matériels pour l'extraction d'ARN total avec le kit « RNAgents »

- * Kit d'extraction d'ARN total RNAgents® (Promega) (Tableau II 12)
- * PBS stérile (Tableau II 13)
- * Éthanol 75 % (à partir d'éthanol absolu-Merck)
- * Pipettes pasteurs stérilisées (Bilbate)
- * Eau nuclease-free (Promega)
- * Centrifugeuse (Heraeus Sepatech)

Protocole RNAgents (selon les instructions du fabricant)

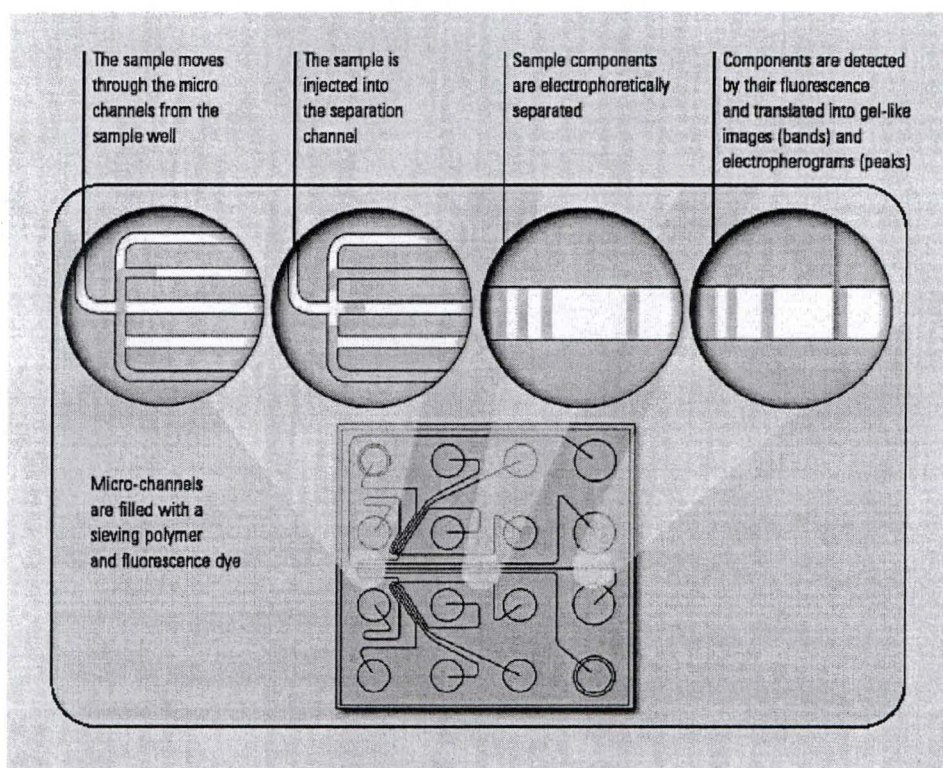
L'extraction se déroule en trois étapes majeures. La première est l'extraction proprement dite de l'ARN total, la seconde est la précipitation et la resuspension de l'ARN total, et la dernière étape est le lavage de l'ARN total.

Le milieu de stimulation est décanté et les cellules lavées avec 5 à 10 ml de PBS stérile à 4°C. Le PBS est décanté et les cellules sont incubées 1 minute sur glace. Le PBS est ensuite redécanté totalement à l'aide d'une pipette pasteur. L'ajout de 600 µl (pour 5 10^6 cellules) de solution dénaturante va rompre les membranes cellulaires, on y ajoute ensuite 60 µl d'acétate de sodium, et on mélange par inversion 4-5 fois. On ajoute ensuite 600 µl de P/C/I et l'on vortexe durant 10 secondes, suivi d'une incubation sur glace de 15 minutes et d'une centrifugation de 20 minutes à 12000 rpm à 4°C.

Après la centrifugation, on récupère la phase aqueuse contenant l'ARN à laquelle on ajoute un volume égal d'isopropanol. L'échantillon est placé à -20°C durant minimum 30 minutes, cette incubation est suivie d'une centrifugation à 12000 rpm durant 10 minutes à 4°C. On élimine ensuite le surnageant et l'on resuspend le culot dans 1 ml d'éthanol à 75 %.

Une dernière centrifugation est réalisée à 12000 rpm durant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est séché à l'air libre. Une fois le culot sec, on le resuspend dans 20 µl d'eau nuclease-free. L'ARN total une fois extrait, est quantifié (#) et conservé à -80°C.

A



B

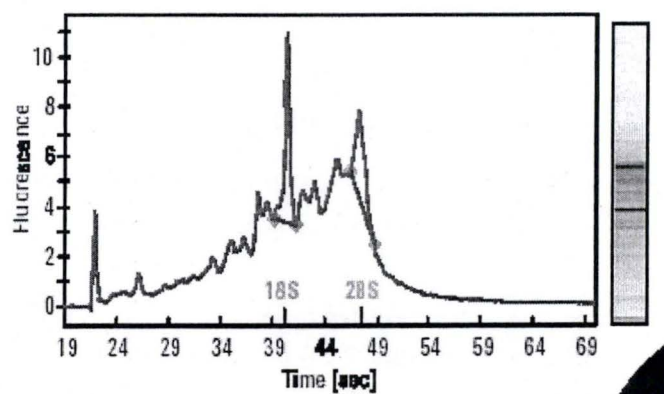


Figure II 3 : A- Principe de la migration des échantillons d'ARN dans la micro-carte. B- Les résultats sont présentés sous forme d'électrophérogrammes ou d'images gel (<http://www.chem.agilent.com/Scripts/PDS.asp?IPage=51>)

(#) Quantification de l'ARN total

La quantification de l'ARN total se fait par spectrophotométrie. La DO (densité optique) des acides nucléiques est mesurée à 260 nm alors que pour les protéines elle se mesure à 280 nm. Le ratio (DO 260/ DO 280) donne une idée de la qualité de l'ARN total (un ARN pur présente un ratio entre 1,8 et 2,0). La concentration en ARN est calculée comme suit : DO 260 nm x 40 x dilution (où 40 est le facteur de correction spécifique à l'ARN).

VII. Vérification de l'intégrité de l'ARN total

Le Bioanalyzer permet de quantifier et de déterminer l'intégrité d'un échantillon d'ARN sur un volume de 1 µl. L'ARN va être déposé dans une micro-carte contenant un gel de migration plus un fluorochrome spécifique de l'ARN simple brin. Sous une différence de potentiel générée par des micro-électrodes, les fragments d'ARN vont migrer plus ou moins rapidement à travers le gel en fonction de leur taille (Figure II 3 A). Un laser assure la détection des fragments un à un.

Les résultats sont compilés sur le programme associé et rendus sous forme d'électrophérogrammes ou d'images gel (Figure II 3 B).

Matériel

- * RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies)
- * RNaseZAP (Ambion)
- * RNA 6000 Ladder (Ambion)
- * Eau Nuclease Free (Promega)
- * Priming station et Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- * Vortex adapté à l'utilisation du Bioanalyzer (IKA Works)

Méthode (selon les instructions du fabricant)

Les électrodes sont nettoyées avant le run avec du RNaseZAP et de l'eau nucléase-free. Le fluorochrome est ajouté fraîchement au gel et centrifugé 10 minutes à 13000 rpm afin d'éliminer toute impureté pouvant gêner la migration. Le gel est ensuite pressurisé à l'intérieur de la micro-carte. On ajoute 2 fois 9 µl de gel dans les puits de nettoyage, 5 µl de marqueur dans chaque puits échantillon et étalon (qui permet l'alignement des profils entre eux), ainsi qu'1 µl d'échantillon ou étalon préalablement dénaturé 2 minutes à 70°C. La micro-carte est vortexée à 2400 rpm durant 1 minute et ensuite chargée dans le BioAnalyzer. Le run dure environ 30 minutes, après lesquelles l'analyse des pics d'ARNr est effectuée. Un ARNtot intègre présente un ratio des aires des pics 28s/18s proche de 2,0.

VIII. Transcription inverse

Le principe de la transcription inverse (RT) est de synthétiser de l'ADN complémentaire à partir d'ARN messager (environ 1 à 5 % de l'ARN total).

Au départ d'amorces polyT qui s'hybrident sur la queue poly-A de l'ARN messager, une transcriptase inverse va synthétiser un brin d'ADNc. Le protocole de la transcription inverse dépend des manipulations effectuées en aval : une hybridation d'ADNc sur un damier à ADN ou une PCR en temps réel. Les différences se situent au niveau du mix d'ARN et du mix de nucléotides. Dans le cas de la RT pour une hybridation, le mix de nucléotides inclut des dCTP biotinylés qui permettront la détection indirecte des ADNc hybridés, et le mix d'ARN inclut des standards internes (ARNm transcrits *in vitro*). Dans le cas de la RT pour une PCR en temps réel, le marquage à la biotine et l'utilisation de standards internes ne sont plus nécessaires.

	RT pour PCR en temps réel	RT pour hybridation sur damier
ARN total	2 µg – 5,5µl	40 µg – 2,5µl
Oligo dT	2 µl	2 µl
Standard interne	/	2 µl
Volume Final	7,5 µl	6,5 µl

Tableau II 14 : Composition des mix d'ARN

	Quantité pour 40 µl
dATP (100 mM)	2 µl
dGTP (100 mM)	2 µl
dTTP (100 mM)	2 µl
dCTP (16 mM)	2 µl
dCTP biotinylés (1 mM)	32 µl

Tableau II 15 : Composition du mix dNTP de la RT pour une hybridation sur damier

	RT pour PCR en temps réel	RT pour hybridation sur damier
Buffer 5 X	4 µl	4 µl
DTT 0,1M	2 µl	2 µl
RNAsin	1 µl	1 µl
dNTP mix	1 µl	2 µl
Eau RNase-free	1 µl	/

Tableau II 16 : Composition des mix de RT (quantité par échantillon)

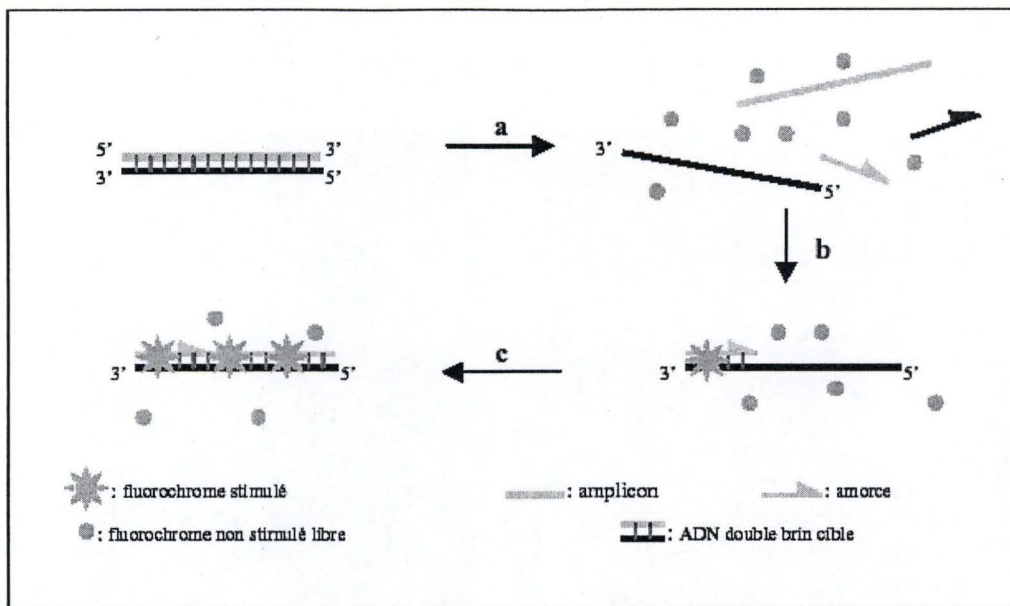


Figure II 4 : Principe de la PCR en temps réel avec un agent s'intercalant dans l'ADN double brin : le SYBR Green. (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green libre émet peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant, résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au double brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel (Poitras *et al.*, 2002).

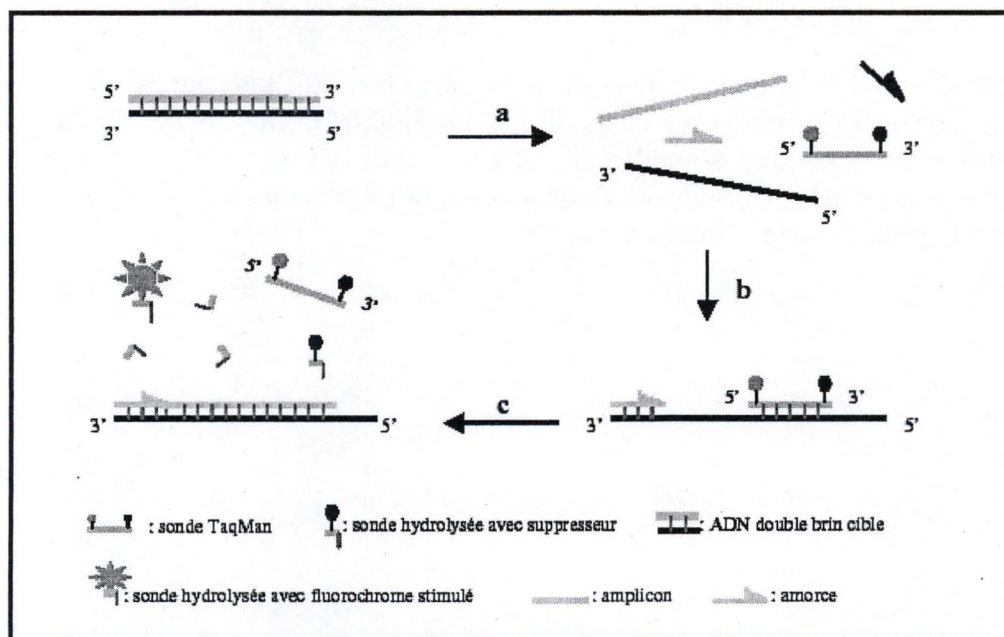


Figure II 5 : Principe de la PCR en temps réel avec hydrolyse de sondes : Sondes TaqMan. La sonde Taqman est composée de 2 fluorochromes : un quencher et un émetteur. Lorsque la sonde n'est pas hydrolysée, le quencher absorbe la fluorescence de l'émetteur. (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives mais la proximité du quencher sur la sonde Taqman empêche la fluorescence. La polymérisation débute. (c) L'enzyme Taqman (3' polymérase et 5' exonucléase) se déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du quencher permettant ainsi l'émission de la fluorescence (Poitras *et al.*, 2002).

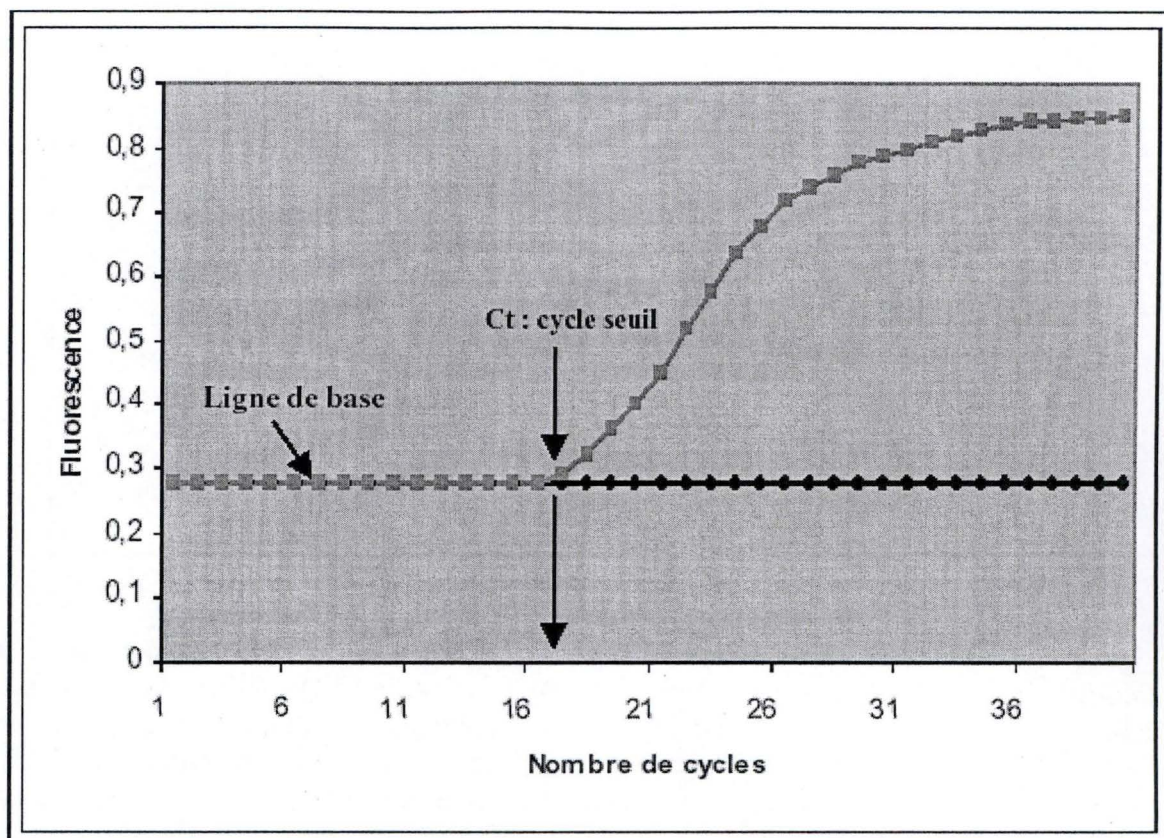


Figure II 6 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle au nombre d'amplicons. Le cycle seuil (Ct ou Cycle treshold) représente le cycle auquel le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Poitras *et al.*, 2002).

Matériels pour les 2 types de RT

- * RNAsin Ribonuclease Inhibitor (40U/μl) (Promega)
- * Ribonuclease H (InVitrogen)
- * Nuclease free water (Promega)
- * Oligo dT (500ng/μl) (InVitrogen)
- * SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (InVitrogen)
- * Blocs chauffants à 37°C, 42°C, et 70°C (Techne Dri-Block)
- * Tips à filtres (Greiner bio-one)
- * Microtubes de 1,5 ml (Starstedt)
- * Gants "powder free" (Mönlycke Health Care)

Matériels spécifiques pour une RT pour hybridation sur damier

- * dNTP set (Roche)
- * Biotin-11dCTP (Perkin Elmer)
- * Bloc chauffant à 95°C (Dri-Block)
- * Mix standards internes (Eppendorf)

Matériel spécifique pour une RT pour une PCR en temps réel

- * dNTP set (Eurogentec)

Méthode

Le mix d'ARN total (Tableau II 14) est préparé et incubé durant 10 minutes à 70°C et ensuite immédiatement placé 5 minutes sur glace. Durant l'incubation, les mix dNTP et de RT sont préparés (Tableau II 15 et II 16). 9 μl du mix de RT sont distribués dans chaque échantillon et ceux-ci sont incubés à température ambiante durant 5 minutes.

Après cette étape, on ajoute 1,5 μl de Superscript II et on incube les échantillons durant 1h30 à 42°C. Pour la RT pour une hybridation sur damier, cette dernière étape est effectuée une deuxième fois. Après l'incubation à 42°C, les échantillons sont incubés 15 minutes à 75°C pour inhiber la Superscript II.

La dernière étape consiste à éliminer les brins d'ARNm toujours liés à l'ADNc. Pour cela, on ajoute 1 μl de RNaseH et on incube 20 minutes à 37°C. Pour l'hybridation sur damier, les échantillons sont dénaturés 3 minutes à 95°C. Une fois la transcription inverse terminée, les échantillons sont stockés à -20°C.

IX. PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet de quantifier cycle par cycle le nombre d'amplicons produits lors de la réaction d'amplification PCR (polymerase chain reaction). Cette technologie est basée sur la détection de fluorescence dont l'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Pour avoir un suivi en temps réel de l'amplification, différents systèmes sont utilisés tel que le SYBR green et le système de sondes Taqman. La différence fondamentale entre les deux systèmes est que le SYBR green est un agent intercalant entre les doubles brins d'ADN (Figure II 4), alors que le système Taqman joue sur la reconnaissance spécifique d'une séquence dans l'amplicon par un système de sondes couplées à des fluorochromes, émetteur et quencher (Figure II 5).

La quantification repose sur le concept de cycle seuil ou Ct (cycle treshold) (Figure II 6). Le Ct représente le cycle PCR au cours duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de

		Amorces anti-sens		
		50 nM	300 nM	900 nM
Amorces sens	50 nM	50/50	50/300	50/900
	300 nM	300/50	300/300	300/900
	900 nM	900/50	900/300	900/900

Tableau II 17 : Matrice des combinaisons de concentration en amorces sens et antisens testées pour l'optimisation de la PCR en temps réel (amorce sens / amorce anti-sens)

	Mix ADN	Mix Blanc
ADNc dilué 100 X	5 µl	/
SYBR Green PCR Master Mix 2X	12,5 µl	12,5 µl
Eau milli-Q	2,5 µl	7,5 µl

Tableau II 18 : Composition des mix ADN et blanc (quantité par échantillon)

12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix 2X
2,5 µl d'amorces sens (Cc déterminées)
2,5 µl d'amorces anti-sens (Cc déterminées)
2,5 µl d'eau milli-Q

Tableau II 19 : Composition du mix pour une PCR en temps réel (quantité par échantillon)

12,5 µl de Taqman universal PCR master Mix 2X
1,25 µl de Assays-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix 20X
6,25 µl d'eau milli-Q

Tableau II 20 : Composition du mix pour une PCR en temps réel avec le système de sondes Taqman (quantité par échantillon)

fond. Etant donné que le Ct se trouve dans la phase exponentielle de la réaction, il est possible de déterminer la quantité d'ADN de départ de l'échantillon. En effet, contrairement à la PCR classique, la quantification se fait lorsque tous les réactifs sont encore en excès. Il existe une corrélation inversement proportionnelle entre ces deux données, le Ct diminuant lorsque la quantité d'ADNc de départ est plus élevé.

L'utilisation de l'agent intercalant SYBR Green nécessite une étape de vérification de la spécificité de l'amplicon. Une courbe de dissociation est réalisée après le 40^{ème} cycle PCR, la température augmente jusqu'à 95°C et les amplicons vont se dissocier à leur température de melting. Un pic de dissociation est obtenu en dérivant la fluorescence en fonction de la température. Si il y a une amplification aspécifique, il y aura plusieurs pics de dissociation à des températures différentes de la température de melting de l'amplicon.

Matériels

- * SYBR green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystem)
- * Taqman Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystem)
- * Amorces sens et anti-sens (Applied Biosystem)
- * Eau milli-Q (Millipore)
- * Tips à filtres (Greiner bio-one)
- * Gants "powder free" (Mölnlycke Health Care)
- * Microtubes (Starstedt)
- * Optical tubes (Applied Biosystem)
- * Optical caps (Applied Biosystem)
- * 96-well optical reaction plate (Applied Biosystem)
- * ABI Prism 7000 (Applied Biosystem)
- * Centrifugeuse (Heraeus Sepatech)
- * Vortex (IKA)

Méthode

1. Mise au point des concentrations en amorces.

La mise au point des concentrations en amorces sens et anti-sens consiste en l'optimisation des concentrations en amorces nécessaires pour la PCR de chaque gène étudié. Les concentrations d'amorces choisies sont celles pour lesquelles on obtient le Ct le plus bas, un plateau de PCR le plus haut et pas de dimères d'amorces. Cette optimisation se fait en testant différentes concentrations : 50 nM, 300 nM et 900 nM (Tableau II 17). Pour cela, un mix d'ADNc et un mix blanc sont réalisés, ceux-ci contenant respectivement de l'ADNc dilué 100 X et de l'eau milli-Q à la place de l'ADNc (Tableau II 18). Dans chaque puits, on dépose 20 µl de mix (ADN ou blanc selon le design de la plaque), auxquels on ajoute les 2,5 µl d'amorces sens et anti-sens à la concentration finale voulue, et ce pour un volume final de 25 µl par puits.

2. Comparaison des efficacités de PCR.

Une fois les concentrations d'amorces définies, les efficacités de PCR pour les différents gènes étudiés sont comparées à celle d'un gène de référence (la GAPDH dans notre cas). Pour ce faire, une courbe standard est réalisée en comparant les valeurs de Ct obtenues pour le gène de référence et pour le gène d'intérêt. Pour cela, un mix est préparé (Tableau II 19) et 20 µl en sont déposés dans les puits auxquels on ajoute ensuite 5 µl d'ADNc dilué 10, 100, 1000, 10000 et 100000 X. Pour les blancs, on ajoute non pas 5 µl d'ADNc mais 5 µl d'eau. Les résultats une fois obtenus sont analysés sur Excel. Les deux courbes standard doivent être parallèles.

Produits
Hybribuffer A
Hybribuffer B
Ctl positif d'hybridation
Eau Nuclease free
Unibuffer
Tween 20
Blocking reagent
Anticorps anti-biotine couplé à la cyanine 3

Tableau II 21 : Composition du kit d'hybridation Eppendorf

	1	2	3	4	5	6	7
1	hyb ctl +	buffer	AAAT	Acrp 30	ADD1	Adipsin	ASP
2	Agt	IS#1	Agtrap	Actin	Agtr2	IS#3	B3AR
3	Hyb Ctl -	CaMKII	CamKIV	Cav1B	Cav2	Cebp alpha	Cebp beta
4	Cebp delta	Chop10	CL	Clic 4	Collagen	buffer	CPT 1 I
5	CPT1 m	IS#3	CPT2	HSP 60	Cst C	IS#1	Cyclin D3
6	Dhapat	eNOS	ERA	Creb1	Fabp 4	FAS	Hyb Ctl -
7	GAPDH	Gata 2	Gata 3	Glut 4	GPAT	GPD cyto	GPD mit
8	Gsn	IS#2	Gyk	p110 a	HCNP	IS#5	Hp
9	Hyb Ctl -	HSD	HSL	HSP84	HSP86	IL6	iNOS
10	Leptin	rRNA18s	LPKL	LPL1	MCAD	MMP2	NFATC2
11	NFATC4	IS#5	p18	Stat 6	PAI 1	IS#2	PEDF
12	PEPCK 1	Plin A	PPAR d	PPAR g	Pref 1	RAB3D	Hyb Ctl -
13	Renin	IS#4	Resistin	RXR alpha	RXR g	Scd 1	Scd 2
14	Hyb Ctl -	SDF1	SDF2	TBP	Smad 3	IS#6	SPARC
15	Srebp 1	IS#6	TF	TGFB1	TNFA	UCP 2	VEGF A
16	hyb ctl +	buffer	VEGF B	VEGF C	Wnt10b	IS#4	hyb ctl +
17	hyb ctl +	buffer	buffer	buffer	1 ctl +	2 ctl +	3 ctl +
18	4 ctl +	5 ctl +	6 ctl +	7 ctl +	8 ctl +	9 ctl +	10 ctl +

Figure II 7: Design de l'Adipo-Athéro-chip. Les Standard internes sont représentés en jaune, les contrôles d'hybridation positif en rose, les contrôles d'hybridation négatif en vert, les contrôles de fixation en vert clair (Buffer) et la courbe de dilution est représentée en gris. Les gènes de référence (HKG) sont en gras et en vert foncé.

3. Quantification relative.

Un mix contenant les amorces sens et anti-sens aux concentrations précédemment déterminées est préparé (Tableau II 19). 20 µl de mix sont déposés dans chaque puits et on y ajoute 5 µl d'ADN dilué ou 5 µl d'eau pour les puits blancs. La plaque multi-puits est recouverte d'un film optique et est centrifugée pour ramener les 25 µl dans le fond des puits, avant d'être déposée dans l'appareil ABI Prism 7000. Les résultats sont compilés grâce au programme « SDS Software » dans lequel on peut notamment retrouver la courbe de dissociation de chaque gène amplifié. Les résultats obtenus sont traités par Excel.

Les mises aux points en concentrations en amorces sont uniquement réalisées lors de l'utilisation de l'agent intercalant SYBR Green. Le système Taqman « Assays-on-Demand™ » de Applied Biosystem ne demande aucune mise au points et le mix fourni contient les amorces et sondes spécifiques au gène d'intérêt. Le mix de PCR est donc différent du mix pour SYBR Green (Tableau II 20).

X. Damiers à ADN

Le principe des damiers à ADN est basé sur la reconnaissance spécifique par un ADNc biotinylé, d'un trappeur simple brin – généré par PCR - fixé sur un support fonctionnalisé. Les trappeurs sont des séquences spécifiques correspondant à une série de gènes d'intérêt.

Matériels

- * AdipoChips (développée à l'URBC par l'équipe du Dr. Th. Arnould)
- * Kit hybridation (Eppendorf) (Tableau II 21)
- * Thermomixer (Eppendorf)
- * Couvre-objet et chambres d'hybridations (Genetic Slide Dryer)
- * Centrifugeuse (Heraeus Sepatech)
- * Scanner confocal : Scan Array Express (Perkin Elmer)

Méthode

L'hybridation sur damier se réalise en plusieurs étapes bien précises. La première est la préparation des échantillons et l'hybridation, la seconde est l'étape de révélation et la dernière est la quantification et l'analyse des résultats.

1. *Design du damier*

Les 89 sondes de capture de l'AdipoChips (Figure II 7) représentent des séquences d'ADN spécifiques de gènes murins impliqués dans le métabolisme lipidique et l'adipogenèse. Des sondes de capture contrôles ont également été ajoutées sur le damier afin de s'assurer du bon fonctionnement des différentes étapes expérimentales menant à l'acquisition des résultats.

Nous retrouvons des contrôles de fixation positifs (trappeur simple brin biotinylé) et négatifs (tampon de spotting seul) qui ont trait au bon déroulement du spotting. Les premiers doivent toujours être allumés alors que les seconds doivent rester indétectables. Nous avons ensuite des contrôles d'hybridation positifs (séquence ADN non murine dont la cible biotinylée est introduite dans le mix d'hybridation) et négatifs (séquence ADN non murine pour laquelle aucune séquence complémentaire n'est introduite lors de l'hybridation). Si le contrôle positif ne s'allume pas, cela signifie que l'hybridation n'a pas eu lieu correctement. Pour les contrôles de fixation et d'hybridation négatifs, s'ils peuvent être détectés, cela suggère une contamination et une non-spécificité des trappeurs présents sur le damier. À ces différents contrôles viennent s'ajouter les contrôles de RT ou standards internes qui permettent de vérifier si la transcription inverse s'est bien déroulée (ARNm transcrit *in vitro* introduit au début de la RT) et de normaliser les résultats lors de la quantification.

	Quantité
Hybribuffer A	6,5 µl
Hybribuffer B	26 µl
Ctl Positif d'hybridation	7 µl
Eau Nuclease Free	5 µl
Produit de RT	20,5 µl

Tableau II 22 : Mix d'hybridation pour les damiers à ADN

Chaque spot représente un gène, et est présent en triplicat dans trois zones séparées du damier. La figure II 5 représente le premier réplicat.

2. *Hybridation sur Adipochips*

Un mix d'ADN est préparé (Tableau II 22) et chauffé dans un four à 60°C quelques minutes. Les 65 µl du mix sont déposés dans la chambre d'hybridation en veillant à ne pas toucher le damier. Les chambres d'hybridation sont ensuite recouvertes d'un couvre-objet et placées durant une nuit dans le thermomixer à 60°C et 1400 rpm.

3. *Révélation*

Une fois l'hybridation terminée, une série de lavages est effectuée avec le Washing Buffer, ce qui permet d'éliminer les ADNc non hybridés. La révélation se réalise par l'ajout d'un anticorps dirigé contre la biotine et couplé au fluorochrome Cyanine-3 (Cy3). Une seconde série de lavages, permet d'éliminer les anticorps excédentaires.

Pratiquement, les chambres et les couvre-objets sont retirés et les lames directement plongées dans le Washing Buffer (Unibuffer dilué 40 X et Tween 20 0,1%). Elles sont lavées 4 X 2 minutes avant d'être révélées avec 800 µl d'anticorps dilué 1000 X dans le Blocking Buffer (Unibuffer dilué 4 X + Blocking reagent 0,1%). Les lames sont ensuite lavées 5 X avec le Washing Buffer durant 2 minutes et ensuite 2 X 2 minutes avec de l'eau distillée. Les lames sont séchées par centrifugation à 600 rpm durant 5 minutes à 20°C.

4. *Quantification*

Les lames sont scannées à l'aide d'un scanner confocal à différents gains (100, 80 et 60) au moyen du programme ScanArray Express (Perkin Elmer). Les différents spots du damier fluorescent avec une intensité qui est proportionnelle à la quantité de cibles hybridées. Les images obtenues sont enregistrées dans un format TIFF et quantifiées avec le programme Imagen 5.0. Les résultats sont traités sur Excel au moyen du programme Statistical Software. Le traitement repose sur une normalisation d'abord par rapport aux standards internes, et ensuite par rapport aux gènes de référence, dont l'expression reste en principe stable dans les différentes conditions de stimulations utilisées.

Résultats et Discussion

<i>Gènes</i>	<i>Amorces sens</i>	<i>Amorces Anti-sens</i>	<i>Tm de l'amplicon (°C)</i>
GAPDH	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	82
MNSOD2	5'-CAAATTGCTGCTTGTCCAAATC-3'	5'-CGTGCTCCCACACATCAATC-3'	80
COX2	5'-ATTAGCCTGAATGTGCCATAAGACT-3'	5'-ACCCACAGTGCTTGACACAGAAT-3'	75
IL-1β	5'-CTTAAAGCCCGCCTGACAGA-3'	5'-AATAGGGAAGCGGTTGCTCAT-3'	80
TNF-α	5'-TTGATCCCTGACATCTGGAATCT-3'	5'-CTGGAAACATCTGGAGAGAGGAA-3'	80
THBD	5'-TCAGGTCCTCAGAGAATTTCTACCA-3'	5'-AGCCTAGGATTCTGCATTTCTAACC-3'	80
Plau	5'-CTGTGACCAGCACTGTCTCAGTTT-3'	5'-CCCAGTGAGGATTGGATGAAC-3'	79
uPAR	5'-GCTATATGGTAAGAGGCTGTG-3'	5'-CCCACTGCGGTACTGGACAT-3'	82
ICAM-1	5'-GCAGTGGTGCAATCATGGTT-3'	5'-CCATGCTACATTTGCCGAAGA-3'	82
IL-6	5'-TGGCTGCAGGACATGACAA-3'	5'-CCATGCTACATTTGCCGAAGA-3'	81
CD36	5'-AACTGGATTCACTTTACAATTTGCAA-3'	5'-TCCCAGTCTCATTAAAGCCAAA-3'	75
MCP-1	5'-CATTGTGGCCAAGGAGATCTG-3'	5'-AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGGAGTT-3'	81

Tableau III 1 : Tableau reprenant les séquences ADN des amorces PCR pour chaque gène étudié ainsi que la Tm des amplicons générés entre ces amorces.

I. Effet de divers agonistes de PPAR sur l'expression génique induite par le LPS – Etude par PCR en temps réel

Le but de ce travail est d'étudier les effets potentiellement anti-inflammatoires des PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) en comparant par PCR en temps réel l'expression de différents gènes d'intérêt dans les conditions LPS en présence ou non d'un agoniste des PPARs chez les macrophages humains. Pour ce faire, nous utilisons des cellules THP-1 préalablement traitées avec du PMA ce qui les différencie en macrophages adhérents. Une condition CTL est à chaque fois réalisée pour observer le taux basal d'expression du gène cible.

L'approche par PCR en temps réel est utilisée pour étudier l'expression de gènes d'intérêt au niveau des ARNm. Le principe et la méthode de la PCR en temps réel sont expliqués au point IX du Matériel et Méthodes.

Le choix des gènes étudiés s'est basé sur les résultats préliminaires obtenus par Vanessa Suin (Suin, 2003) sur les monocytes THP-1 au cours de son mémoire dans le cadre de la validation de la DualChip Human General (EAT). Elle avait confirmé par PCR en temps réel que le LPS induisait l'expression de SOD2 (enzyme antioxydante), d'ICAM-1 (protéine d'adhérence), du THBD (thrombomoduline, une protéine régulant négativement la thrombine) et de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et le TNF- α . Nous avons élargi cette liste aux gènes suivants :

- le MCP-1, une chémokine exprimée sur les monocytes ainsi que Plau et uPAR, car ces deux derniers interviennent aussi dans la transmigration des monocytes.
- le CD36, un récepteur scavenger, marqueur des macrophages activés et reconnus pour être régulé par PPAR γ .
- l'IL-6 et la COX2 (cyclooxygénase-2), tous deux sont marqueurs du macrophage activé et reconnus pour être positivement régulés par le LPS.
- l'IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3), facteur de croissance produit par les monocytes stimulés au LPS.

Le tableau III 1 reprend les séquences des amorces PCR utilisées pour chacun de ces gènes ainsi que la température de melting (Tm) de l'amplicon, définis au moyen du programme Primer Express (Applied Biosystems). En ce qui concerne le gène encodant IGFBP3 qui a été étudié au moyen du système des sondes Taqman, le service « Assays-on-Demand » de Applied Biosystems ne communique que la séquence de la sonde qui est : 5'-FAM-GCGCCGCCAGTCCAGGAAATGCTA-NFQ-MGB-3' (FAM = émetteur, NFQ = quencher non fluorescent, MGB = minor groove binder qui permet la stabilisation de la sonde sur sa séquence ADN et augmente la Tm de la sonde, ce qui permet d'avoir une plus grande spécificité). La sonde spécifique de la GAPDH en système Taqman est : 5'-FAM-GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT-NFQ-MGB-3'. Rappelons que la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase) est utilisée comme gène de référence (ou House Keeping Gene).

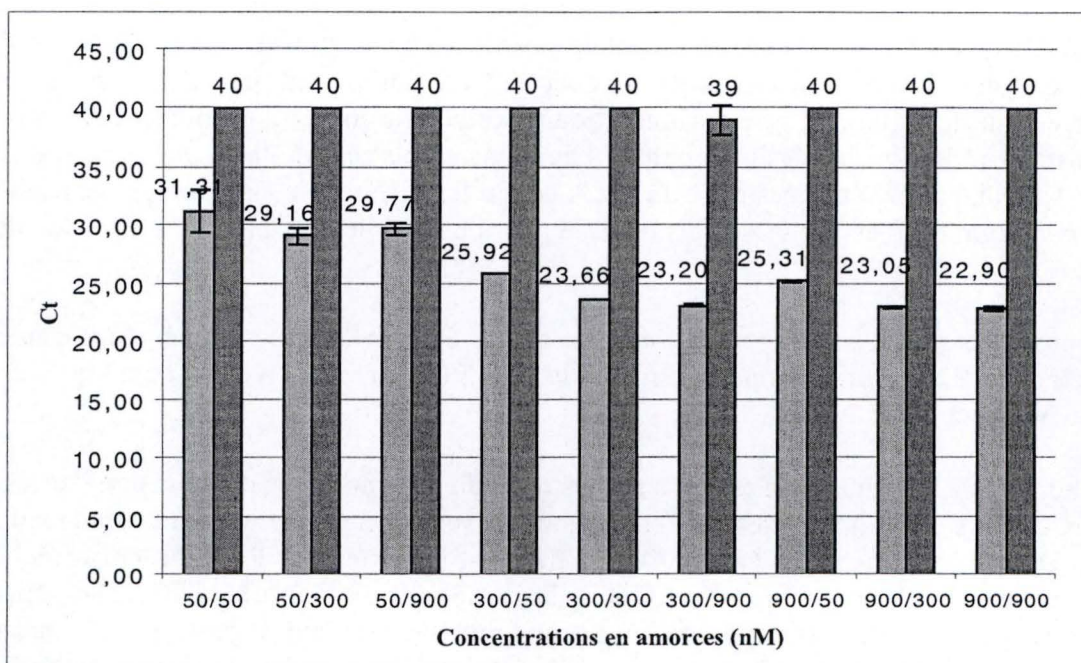


Figure III 1 : Résultats graphiques de la matrice d'amorces pour CD36 : Le graphe reprend les valeurs de Ct en fonction des combinaisons de concentrations en amorces testées (colonnes claires = CD36 , colonnes foncées = blancs)

I A. Mises aux points préliminaires

Dans le cadre de l'étude par PCR en temps réel, il a été nécessaire d'effectuer de nouvelles mises au point des concentrations en amorces utilisées. En effet, les conditions préalablement établies sur le modèle cellulaire des monocytes THP-1 peuvent être différentes après la différenciation des cellules en macrophages.

Dans un premier temps, les mises au point ont consisté à déterminer **les concentrations en amorces** pour les différents gènes étudiés (voir Matériel et Méthode au point IX). Pour ce faire, une PCR en temps réel est réalisée avec différentes combinaisons d'amorces sens et anti-sens. Une analyse des Ct (Cycle threshold) est effectuée sur base des graphes d'amplification de chaque gène. Les concentrations choisies sont celles pour lesquelles le Ct est le plus bas et les blancs possèdent un Ct de 40 au minimum (pas d'amplification).

Dans l'exemple du gène encodant CD36 et présenté à la figure III 1, nous avons choisi une concentration en amorces sens de 900 nM et en amorces anti-sens de 900 nM. A ces concentrations, le Ct est le plus bas (Ct = 22,9) et les blancs ne sont pas amplifiés (Ct \geq 40). Dans le cas de la concentration en amorce sens de 300 nM et en amorce anti-sens de 900 nM, on observe une amplification aspécifique, le Ct du blanc étant inférieur à 40. Cette amplification aspécifique peut être due soit à une contamination en ADN soit à un dimère d'amorce. Etant donné que nous n'observons pas d'amplification aspécifique avec la combinaison 900/900, il semble plus probable qu'il s'agisse ici d'une contamination en ADN lors de la préparation des échantillons.

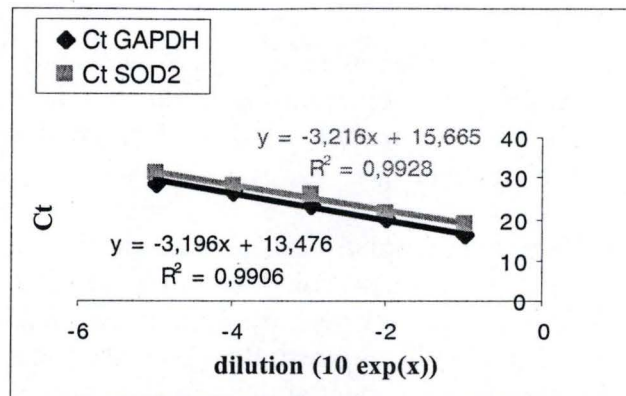
Les mises au point des concentrations en amorces ont été réalisées pour tous les gènes d'intérêt précités. Les résultats sont résumés sous forme de tableau ci-dessous (tableau III 2).

<i>Gène d'intérêt</i>	<i>Cc Amorce Sens</i>	<i>Cc Amorce Anti-sens</i>
GAPDH MnSOD2 COX2 IL-1 β TNF- α THBD Plau uPAR	300 nM	300 nM
ICAM-1 IL-6 CD36 MCP-1	900 nM	900 nM

Tableau III 2 : Tableau récapitulatif des mises au point des concentrations en amorces sens et anti-sens pour les différents gènes étudiés par PCR en temps réel.

Dans un second temps, nous avons **comparé les efficacités** de PCR (voir Matériel et Méthodes au point IX) pour chaque gène d'intérêt par rapport à un gène de référence, la GAPDH dans notre cas. Des courbes standards ont été réalisées pour chaque gène ainsi que pour la GAPDH en diluant un ADNc de 10 en 10 jusqu'à 100.000 fois. Les droites obtenues

(a)



(b)

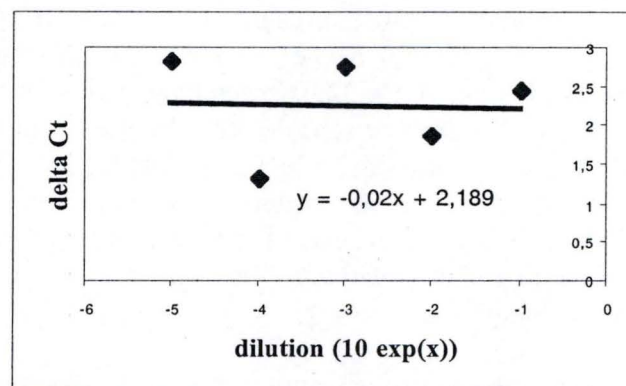


Figure III 2 : Comparaison des efficacités de PCR entre les gènes encodant la MnSOD2 et la GAPDH. (a) Graphe représentant les courbes standards pour les 2 gènes avec leur équation respective ; (b) Graphe représentant la droite obtenue par soustraction des Ct des 2 courbes standards à chaque point de dilution.

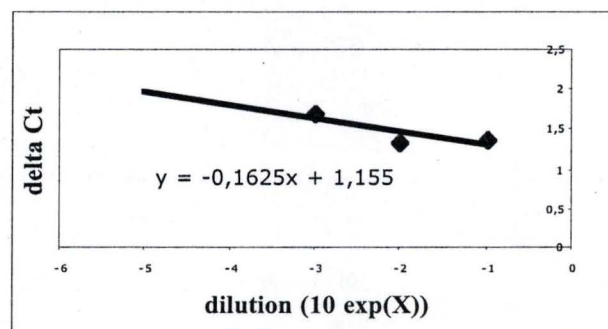


Figure III 3 : Comparaison des efficacités de PCR entre les gènes encodant THBD et GAPDH. Le graphe représente la droite obtenue par soustraction des Ct obtenus pour chaque point de dilution entre la courbe standard THBD et la courbe standard GAPDH.

en rapportant les Ct en fonction des dilutions pour le gène d'intérêt, ainsi que pour le gène de référence, nous permettent de calculer les efficacités de PCR par la formule suivante :

$$E (\%) = (10^{(-1/a)} - 1) \times 100 \quad \text{où } E \text{ est l'efficacité de PCR en \% et } a \text{ la pente de la droite.}$$

Pour que 2 efficacités de PCR soient comparables, les droites obtenues doivent être parallèles (et donc avoir une pente similaire). Pour le vérifier, on réalise un second graphique reprenant les δCt ($Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) en fonction des dilutions. La droite résultante doit présenter une pente inférieure à 0,1 en valeur absolue, ce qui signifie que les efficacités de PCR sont comparables. Ce dernier point est essentiel pour choisir la méthode de calcul des taux d'expression génique. En effet, si les droites sont comparables, nous pouvons utiliser la méthode des $\delta\delta Ct$ qui est une méthode simple et rapide pour calculer les différences d'expression génique (description au point I.B-A du chapitre Résultats et discussion). Dans le cas contraire, la nécessité de réaliser des courbes standards pour chaque gène à chaque expérience est plus fastidieuse et consommatrice en matériel de base.

Pour le gène d'intérêt MnSOD2 par exemple, son efficacité de PCR est comparable à celle de la GAPDH étant donné que la pente de la droite de δCt est de -0,02 (figure III 2). Les efficacités de PCR sont de 106 % pour la GAPDH et 105 % pour la MnSOD2.

Pour le gène encodant THBD par contre, lors du premier essai, la pente de la droite du δCt était supérieure à 0,1 (Figure III 3). Une nouvelle combinaison d'amorces sens et anti-sens a dû être testée. Par ailleurs, lors du premier essai, la droite des δCt ne comportait que 3 points, ce qui est insuffisant pour définir précisément la pente de la droite et donc l'efficacité de PCR. Un problème lors de la préparation des échantillons peut en être la cause.

Toutes les efficacités de PCR testées pour les différents gènes d'intérêts (cités dans le tableau III 2) au cours des mises au point sont bien comparables avec celle du gène encodant la GAPDH. La même méthode de calcul ($\delta\delta Ct$) a donc pu être utilisée au cours de ce mémoire. Ces mises au point terminées, nous avons pu réaliser les expériences de détermination des niveaux d'expression génique dans nos conditions de stimulation.

I B. Détermination des changements d'expression génique

1. Résultats

La technique de PCR en temps réel permet une étude rapide et simple de l'expression génique de gènes d'intérêt au niveau des ARNm. Cette technique est basée sur la détection de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'ADNc amplifié par PCR (voir chapitre Matériel et Méthodes au point IX).

Comme décrit préalablement dans le chapitre Matériel et Méthodes aux points II et IV, les monocytes THP-1 sont différenciés en macrophages en présence de PMA, ensuite stimulés avec le LPS en présence ou non des agonistes des PPARs (RO, GW et PGJ2) durant 6 heures. Ce temps de stimulation a été choisi suite à des expériences de cinétique préalablement mises au point lors du travail de thèse de Sofia Dos Santos.

Nous avons sélectionné trois agonistes différents :

- la RO ou rosiglitazone est un agoniste à haute affinité pour la PPAR γ .
- le GW ou GW501516 est un ligand pour le PPAR β/δ dont le rôle anti-inflammatoire est peu connu
- enfin le PGJ2 ou 15d-PGJ2 est aussi un ligand du PPAR γ , mais on sait d'après la littérature qu'il exerce des effets anti-inflammatoires PPAR γ dépendant et PPAR γ indépendant (Panzer et al., 2002 et Collin et al., 2004)

Les ARN totaux extraits pour les 5 conditions - CTL, LPS et LPS + agoniste - ont été quantifiés par spectrophotométrie (voir Matériel et Méthode au point VI). Les ratios 260 nm/280 nm obtenus pour les extractions avec le kit RiboPure sont compris entre 1,7 et 2,2 ce qui correspond à des ARN de bonne qualité. Quant à la quantité d'ARN total extrait, elle varie aussi entre les différentes extractions réalisées au cours du mémoire (voir tableau III 3).

	CTL	LPS	LPS + RO	LPS + PGJ2	LPS + GW
Nombre de cellules	5. 10 ⁶	5. 10 ⁶	5. 10 ⁶	5. 10 ⁶	5. 10 ⁶
Ratio 260 nm/280 nm	De 1,7 à 1,9	De 1,7 à 2,0	De 1,7 à 1,9	De 1,7 à 1,8	De 1,7 à 2,2
Concentration en ARN total extrait	De 208 à 885 ng/ μ l	De 224 à 870 ng/ μ l	De 225 à 654 ng / μ l	De 516 à 575 ng/ μ l	De 87 à 731 ng/ μ l
Quantité d'ARN total pour 100 μ l	20,8 à 88,5 μ g	22,4 à 87 μ g	22,5 à 65,4 μ g	51,6 à 57,5 μ g	8,7 à 73,1 μ g

Tableau III 3 : Tableau récapitulatif des ratios et des quantités d'ARN total extrait avec le kit RiboPure dans les conditions : CTL, LPS, LPS + RO , LPS + PGJ2 et LPS + GW.

Pour tous les gènes étudiés, dont l'efficacité est comparable avec celle de la GAPDH, le calcul du taux d'expression génique se réalise par la méthode des $\delta\delta$ Ct décrite ci-après.

La moyenne des Ct est calculée pour chaque gène dans chaque condition expérimentale (échantillon dans 2 puits séparés). Ensuite, le δ Ct est calculé dans chacune des conditions étudiées par la formule suivant : (δ Ct = moyenne des Ct gènes d'intérêt – moyenne des Ct GAPDH). Le calcul des δ Ct permet ensuite de calculer le $\delta\delta$ Ct pour chaque gène étudié d'après la formule (δ Ct de la condition de stimulation (LPS avec ou sans un agoniste des PPARs) – δ Ct de la condition contrôle). La sur- ou sous- expression génique d'un gène peut alors être déterminée par la formule suivante : $2^{\exp(-\delta\delta \text{ Ct})}$.

Nous allons décrire dans les paragraphes suivants les résultats obtenus au cours du mémoire pour les différents gènes étudiés.

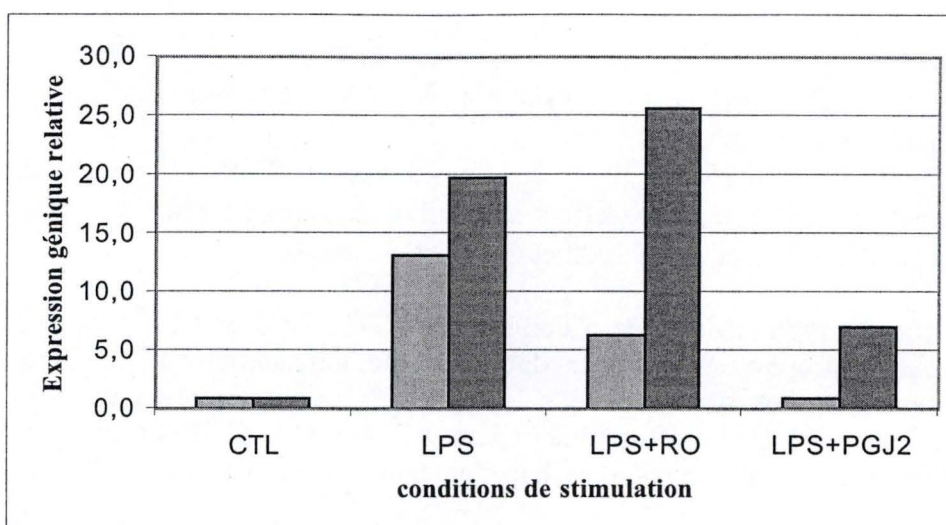


Figure III 4 : Représentation graphique de l'expression génique relative des gènes TNF α et IL-1 β dans différentes conditions de stimulation : LPS, LPS + PGJ2 et LPS + RO par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1. Les cellules sont stimulées avec le LPS (5 μ g/ml) et éventuellement pré-incubées avec la PGJ2 (6 μ M final) ou avec la rosiglitazone (2 μ M final). Les colonnes claires correspondent au TNF α et les colonnes foncées à l'IL-1 β .

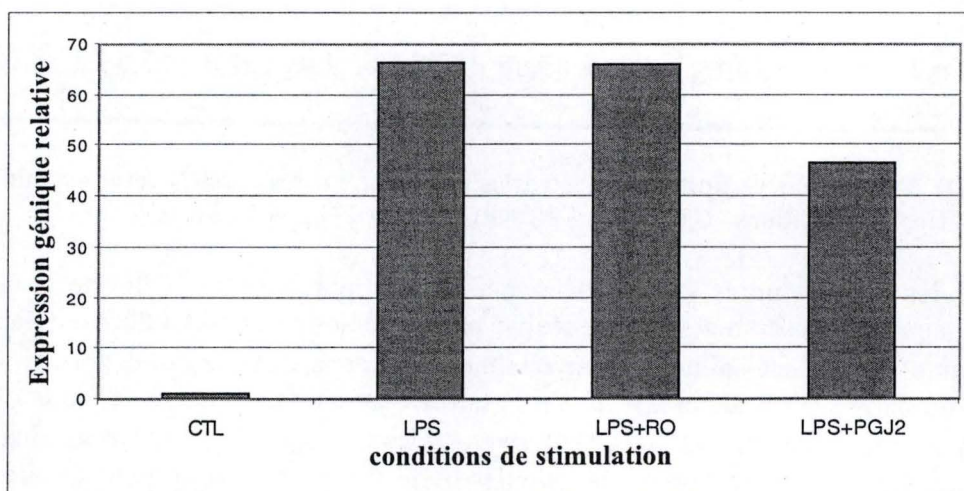


Figure III 5 : Représentation graphique de l'expression génique relative de MnSOD2 dans les conditions de stimulation LPS, LPS + RO et LPS + PGJ2 par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1. Les cellules sont stimulées avec le LPS (5 μ g/ml) et éventuellement pré-incubées avec la Rosiglitazone (2 μ M final) ou avec la PGJ2 (6 μ M final).

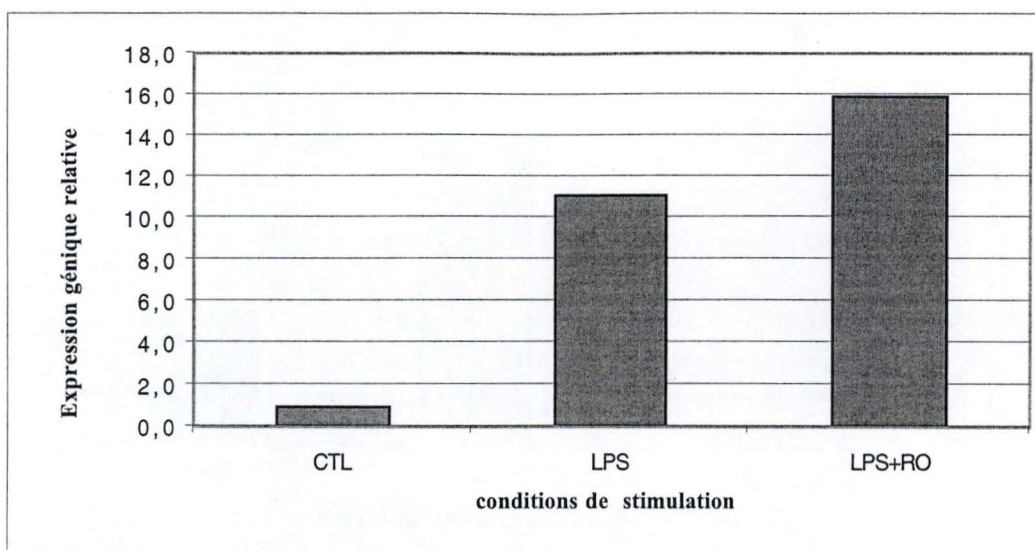


Figure III 6 : Représentation graphique de l'expression génique relative de COX2 dans les conditions de stimulation LPS et LPS + RO par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1. Les cellules sont stimulées avec le LPS (5 μ g/ml) et éventuellement pré-incubées avec la Rosiglitazone (2 μ M final).

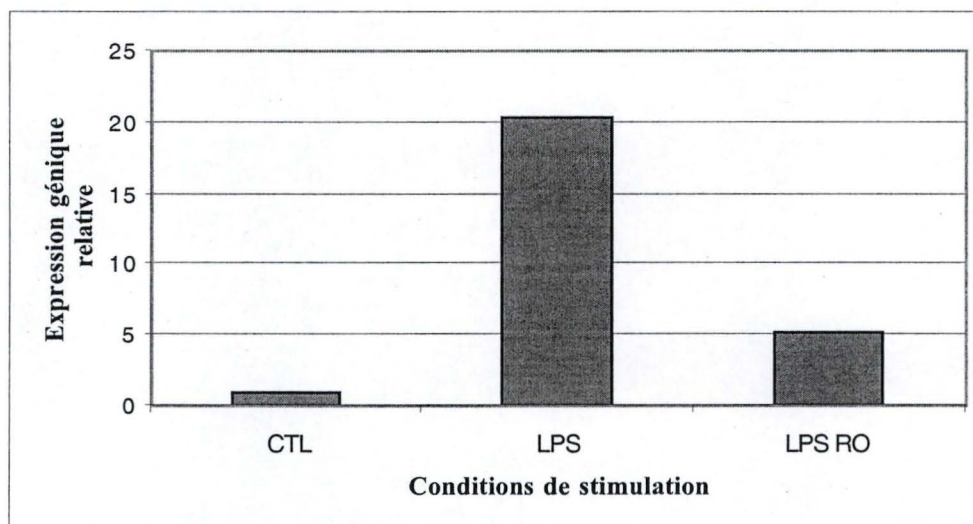


Figure III 7 : Représentation graphique de l'expression génique relative de MCP-1 dans les conditions de stimulation LPS et LPS + RO par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1. Les cellules sont stimulées avec le LPS (2 μ g/ml) et éventuellement pré-incubées avec la Roziglitazone (2 μ M final).

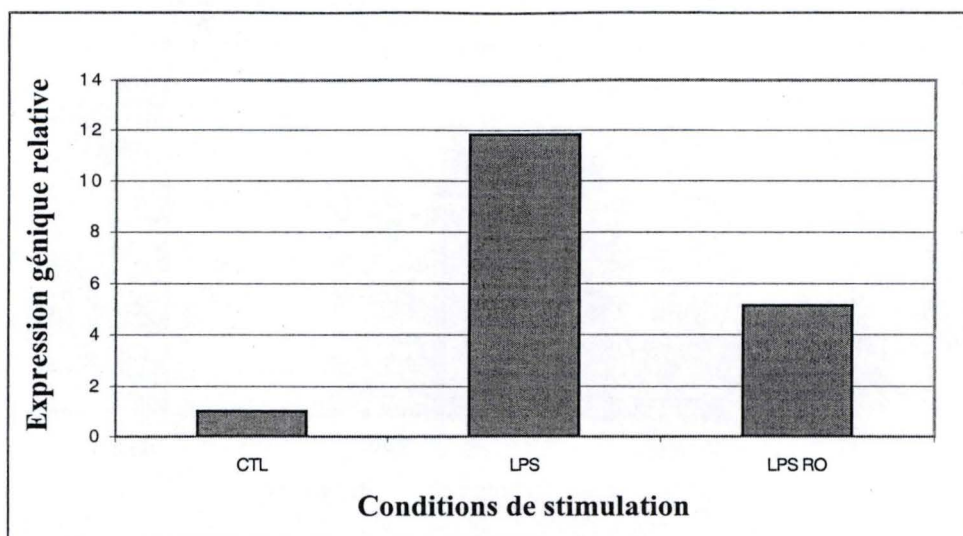


Figure III 8 : Représentation graphique de l'expression génique relative de IGFBP3 dans les conditions de stimulation LPS et LPS + RO par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1. Les cellules sont stimulées avec le LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) et éventuellement pré-incubées avec la Rosiglitazone (2 μM final).

TNF- α et IL-1 β

La figure III 4 représente l'expression génique de deux gènes - **TNF α** et **IL-1 β** - selon les conditions de stimulation suivantes : CTL, LPS, LPS + PGJ2 et LPS + RO. On observe une forte surexpression de l'IL-1 β et du TNF α lors de la stimulation avec le LPS, respectivement de 13,22 X pour le TNF α et de 19,77 X pour l'IL-1 β par rapport au CTL. Lors de la costimulation du LPS en présence du PGJ2, on observe une nette diminution de la surexpression provoquée par le LPS pour les deux gènes étudiés : de 0,87 X au lieu de 13,2 X pour le TNF α et de 7,14 X au lieu de 19,7 X pour IL-1 β par rapport au CTL. Lors de la costimulation du LPS en présence de la RO, on observe une diminution de l'expression du TNF α de 6,25 X le CTL. Par contre on n'observe pas d'effet pour IL-1 β .

MnSOD2

Le graphe présenté en figure III 5 représente l'expression génique de la **MnSOD2** en fonction des conditions de stimulation : CTL, LPS, LPS + RO et LPS + PGJ2. Comme attendu, nous observons une forte surexpression du gène MnSOD2 après stimulation au LPS (66,5 X par rapport au CTL). Lorsque nous pré-incubons avec la rosiglitazone, nous n'observons pas de diminution de l'expression génique (66,0 X par rapport au CTL). Avec la PGJ2, nous observons une faible tendance de l'agoniste à diminuer la surexpression de MnSOD2 LPS-dépendante (46,6 X), mais de façon moins marquée que pour le TNF- α et l'IL-1 β . L'expérience a été réalisée 2 fois.

Nous voyons donc que la RO est incapable de contrecarrer la surexpression de MnSOD2 due au LPS. Par contre, la PGJ2 permet une diminution de l'expression LPS-dépendante de la MnSOD2.

COX2

Les résultats obtenus pour la **COX 2** sont donnés à la figure la figure III 6, en fonction des conditions de stimulation: CTL, LPS et LPS + RO. La stimulation avec le LPS induit bien une surexpression du gène de 11 X par rapport au CTL. Par contre, dans le cas de la costimulation du LPS avec la rosiglitazone, on observe une expression de 15,8 X le CTL. La rosiglitazone est donc incapable de diminuer l'expression de COX2 due au LPS. Cette expérience a été réalisée en double, avec les même résultats.

MCP-1

Les résultats présentés pour **MCP-1** dans la figure III 7, montrent que lors de la stimulation au LPS, il y a une forte surexpression de 20,3 X par rapport au CTL. L'ajout de rosiglitazone suite à une stimulation au LPS diminue le taux d'expression de MCP-1 jusqu'à 5,2 X par rapport au CTL.

Cette expérience a été répétée avec les même résultats. Il y a bien une diminution de l'expression de MCP-1 de l'ordre de 4 X dans les deux tests réalisés en condition LPS + RO par rapport au LPS seul.

IGFBP3

La figure III 8 représente l'expression génique du gène **IGFBP3** en fonction des conditions de stimulation : CTL, LPS et LPS + RO. Une nouvelle fois, on observe une surexpression du gène IGFBP3 de 11,8 X la valeur du CTL lors de la stimulation au LPS. On observe, comme

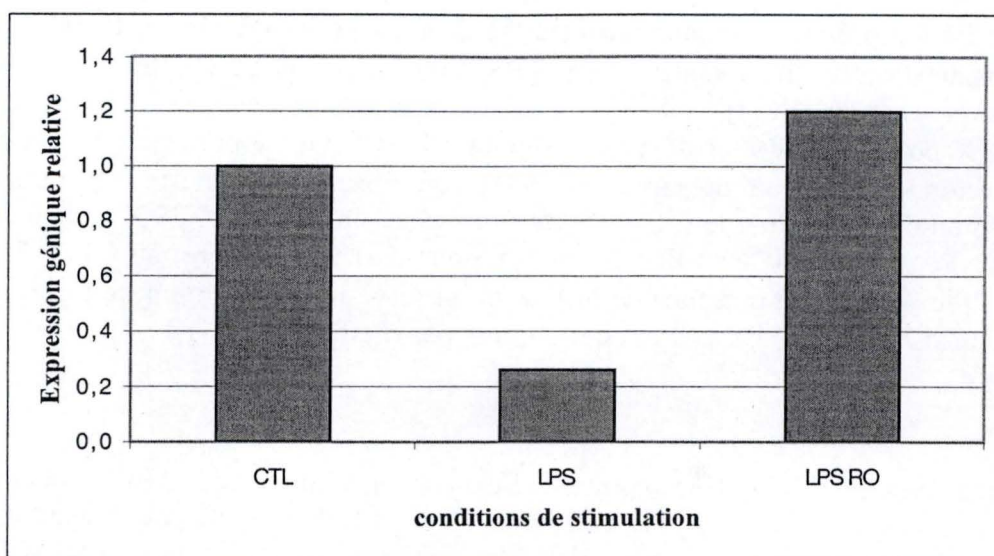


Figure III 9 : Représentation graphique de l'expression génique relative de CD36 dans les conditions de stimulation LPS et LPS + RO par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1. Les cellules sont stimulées avec le LPS (2 μ g/ml) et éventuellement pré-incubées avec la Rosiglitazone (2 μ M final).

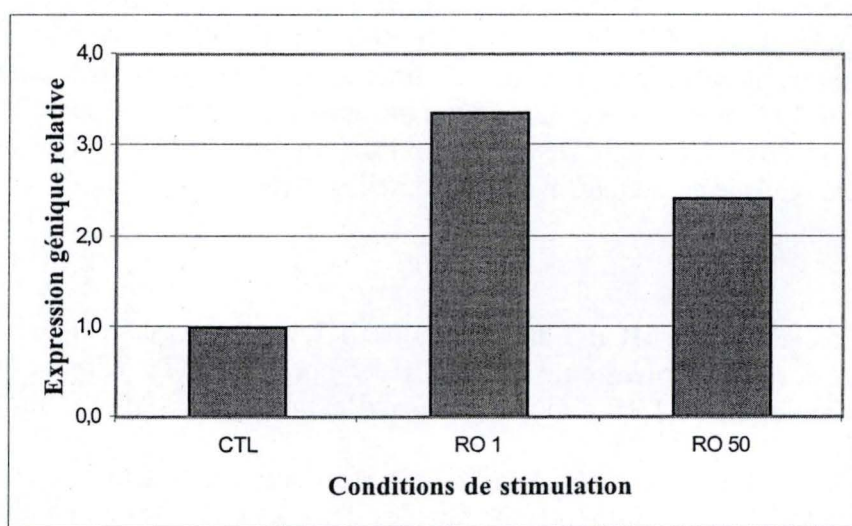
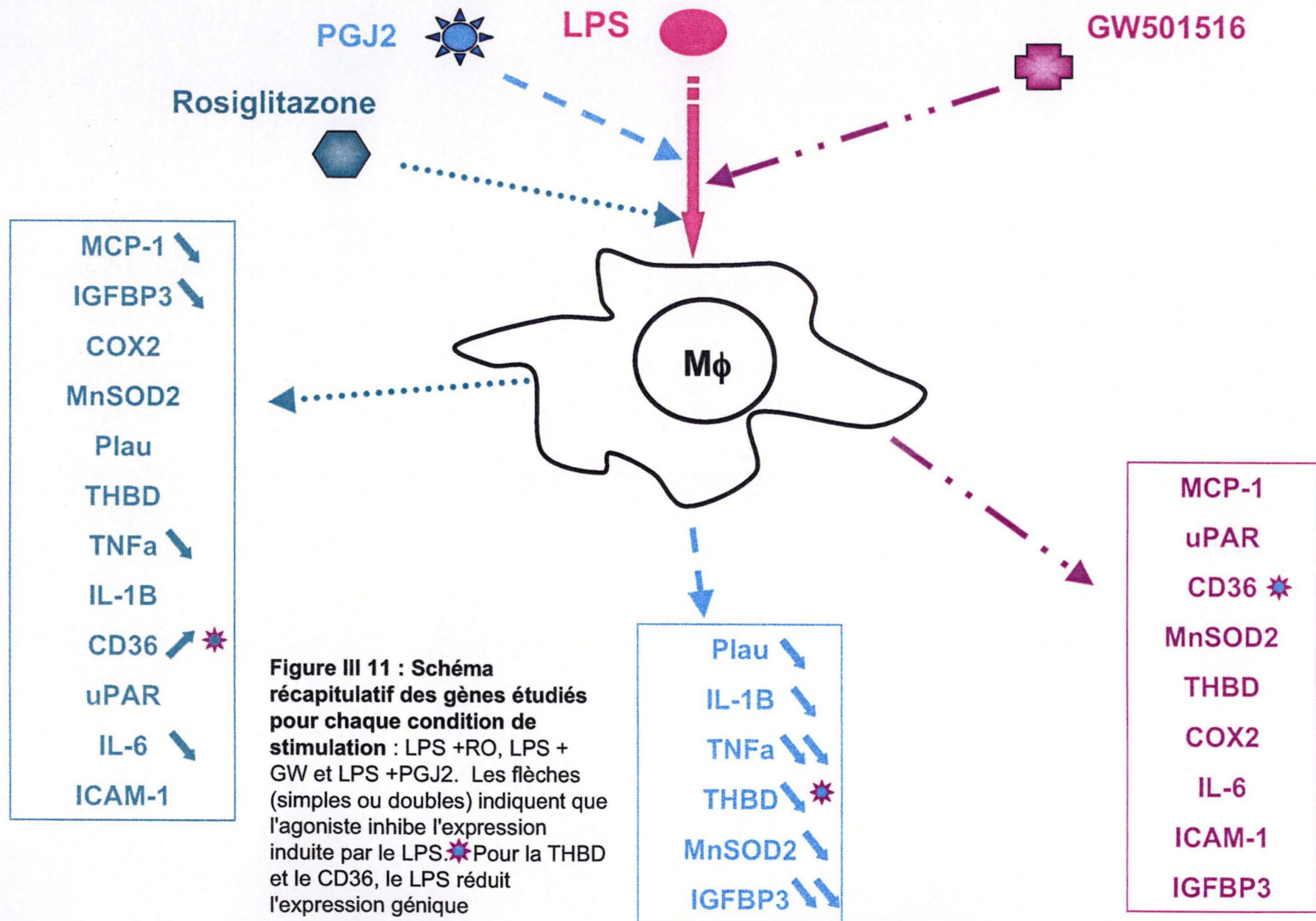


Figure III 10 : Représentation graphique de l'expression génique relative de CD36 dans les conditions de stimulations RO à 1 μ M et à 50 μ M par rapport à la condition contrôle établie arbitrairement à 1.

	Gène	LPS	LPS et agoniste
RO (LPS 2 µg/ ml)	MCP-1	15	3,8
	IGFBP3	11,8	5,1
	COX2	13,18	12,6
	UPAR	1,3	1,5
	IL-6	320	127
	ICAM-1	5,8	5,4
	THBD	0,3	0,2
	MnSOD2	66	53,3
	Plau	1,23	0,89
	COX2	10,23	15,3
	CD36	0,22	1,2
	TNFα	13,22	6,25
	IL-1β	19,77	25,63
PGJ2 (LPS 5 µg/ ml)	TNFα	13,22	0,87
	IL-1β	19,77	7,14
	MnSOD2	66,4	46,6
	Plau	1,76	0,1
	THBD	0,38	0,04
	IGFBP3	22,8	0,87
GW (LPS 2 µg/ ml)	MCP-1	6,4	7,8
	COX2	13	12,3
	IL-1β	14,57	15,24
	MnSOD2	83	97
	THBD	0,4	0,4
	ICAM-1	6,2	5,9
	uPAR	1,2	1,1
	IL-6	592,2	515,6
	CD36	0,24	0,56

Tableau III 4 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus dans les différentes conditions de stimulation : LPS, LPS + RO, LPS + PGJ2 et LPS + GW . Les valeurs indiquées dans le tableau correspondent à l'induction de chaque gène par rapport au CTL qui est arbitrairement défini à 1. En grisé, les gènes pour lesquels les résultats les plus marquants ont été observés.



dans le cas du MCP-1 (présenté à la figure III 6), une diminution de l'expression du gène IGFBP3 lors d'une stimulation simultanée du LPS avec la rosiglitazone (5,1 X par rapport au CTL). Cependant, cette diminution de l'IGFBP3 LPS-dépendante dans la condition LPS + RO (= - 2 X), est moins marquée par rapport à la diminution de 4 X observée pour le MCP-1. Les résultats obtenus pour la diminution d'expression génique de IGFBP3 ont été confirmés plusieurs fois.

IL-6

L'**IL-6** répond de manière similaire que l'IGFBP3 et le MCP-1 lors de la condition LPS + RO (résultats non montrés). L'IL-6 voit son expression LPS dépendante diminuer de 2,5 X.

CD36

Les effets du LPS sur l'expression génique du **CD36** ne suivent pas la même tendance que celle observée pour les autres gènes. On observe cette fois une diminution de l'expression génique de CD36 de 0,26 X par rapport au CTL. L'expression du gène CD36 revient à un niveau d'expression similaire au CTL (1,2 X par rapport au CTL) lors de la stimulation au LPS en présence de RO (figure III 9). Ces résultats nous ont poussés à étudier l'effet de la RO seule sur l'expression du gène encodant CD36. En effet l'équipe de Welch (2003) a rapporté que la RO à de faibles concentrations (~1 μ M) était spécifique du PPAR γ , alors qu'à de plus fortes concentrations (~50 μ M), la RO devient moins spécifique et est capable d'activer PPAR β/δ . Nous avons testé la RO seule à ces deux concentrations. A la figure III 10, on observe bien que le gène encodant CD36 est plus fortement exprimé (3,35 X par rapport au CTL) lorsque la RO est présente en faible concentration (1 μ M), que lorsque la concentration en RO augmente (50 μ M) (2,42 X par rapport au CTL). Nos résultats montrent donc que la RO est capable de contrecarrer les effets du LPS, en ramenant l'expression du CD36 au niveau du CTL.

THBD

Le gène encodant la **THBD** répond de manière similaire au gène encodant CD36 lors de la stimulation au LPS. Il est possible d'observer dans cette condition une diminution de l'expression génique de 0,4 X par rapport au CTL. Par contre lors des stimulations avec le LPS en présence d'agoniste (GW ou RO) il n'est pas possible d'observer des modifications de l'expression génique de THBD par rapport au LPS seul.

ICAM-1, Plau et uPAR

En ce qui concerne les gènes **ICAM-1** et **Plau**, il est possible d'observer une augmentation de leur expression lors de la stimulation au LPS respectivement de 5,8 X et de 1,2 X par rapport au CTL. Les conditions de stimulation avec le LPS et les agonistes de PPAR ne montrent aucune variation de l'expression de ces deux gènes (5,4 X par rapport au CTL pour ICAM-1 et 0,9 X par rapport au CTL pour Plau) (résultats non montrés). En ce qui concerne **uPAR** nous n'avons observé aucune modification de l'expression génique dans les conditions testées (CTL, LPS, LPS + RO et LPS + GW).

Les résultats des modulations d'expression génique des différents agonistes des PPARs sur la réponse inflammatoire LPS-dépendante sont résumés sous forme de tableau (tableau III 4). La figure III 11 récapitule pour chaque agoniste de PPAR, la liste des gènes dont l'expression

a été analysée. Les gènes induits par le LPS, mais dont l'expression est régulée négativement par les agonistes des PPARs, sont indiqués par une flèche descendante simple ou double, selon l'importance de l'effet observé. Les gènes encodant la THBD et le CD36 se démarquent par rapport aux autres gènes puisque le LPS réduit leur expression de base.

2. Discussion

Comme décrit dans la littérature, le LPS est connu comme un déclencheur de la réponse inflammatoire et ce en activant différentes voies de transduction du signal (décrites au point II A - 2 de l'introduction). De nombreux gènes sont surexprimés lors d'une stimulation avec du LPS comme les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF α , les molécules d'adhérence comme ICAM-1, la chémokine MCP-1, les enzymes inductibles telles que l'iNOS et la Cyclooxygénase (COX2). Ces résultats ont été largement décrits dans la littérature par différentes équipes dont celle de Lazarov (2000), de Beck-Schimmer (2002), de Colotta (1992) de Guha (2001) ainsi que de Breder et Saper (1996). L'équipe de Agnese (2002) a quant à elle étudié la surexpression de l'IGFBP3 chez les monocytes THP-1 stimulés au LPS pendant 16h. Ils rapportent un rôle pro-apoptotique du LPS après 16 h de stimulation, mais dans notre contexte, les temps de stimulation plus courts ne nous permettent pas de confirmer cette observation. Cette molécule a en outre été décrite pour ses rôles pléiotropiques (pour revue voir Firth et Baxter, 2002).

Dans les résultats obtenus par PCR en temps réel, nous observons que selon l'agoniste utilisé, les effets des PPARs sur la modulation de l'expression LPS-dépendante de gènes d'intérêts, sont très différents. Tout d'abord le GW ne modifie aucunement l'expression induite par le LPS, ce qui indique que le PPAR β/δ n'aurait pas de propriétés anti-inflammatoires comparables aux isoformes α et γ dans notre modèle. Passons maintenant en revue la PGJ2 et la RO.

PGJ2

Les résultats obtenus pour l'IL-1 β , le TNF α , MnSOD2 ainsi que pour Plau et THBD (résultats non montrés) montrent une diminution de l'expression de ces gènes lors d'une stimulation en présence de LPS et de PGJ2, particulièrement spectaculaire pour le TNF- α et l'IGFBP3. Signalons que l'expression du gène encodant la THBD diminue en présence de LPS et que la présence de PGJ2 accentue encore plus cet effet.

Il a été rapporté dans la littérature par Miwa (2004) que la PGJ2 avait effectivement un effet anti-inflammatoire (Wima et al., 2004). L'équipe de Weber (2004) a aussi rapporté dans la littérature que le PPAR γ n'est pas toujours requis pour l'action inhibitrice de PGJ2 sur l'expression de cytokines dans les cellules pancréatiques- β . En outre, des résultats semblables ont été obtenus lors du travail de thèse de Sofia Dos Santos sur les monocytes THP-1 stimulés avec du LPS et de la PGJ2, or il y a peu ou pas de PPAR γ exprimé chez les monocytes. Les effets de la PGJ2 ne seront donc pas étudiés avec l'approche des damiers à ADN (qui sera détaillé au chapitre III) car il n'est pas certain qu'il s'agisse d'une réponse spécifique à l'activation du facteur de transcription PPAR γ .

Rosiglitazone

Comme le mentionne nos résultats, quatre gènes voient leur expression génique diminuée lors de la costimulation du LPS avec la RO par rapport à une stimulation au LPS seul. Il s'agit de l'IGFBP3, du MCP-1, du TNF α et de l'IL-6. Nous confirmons donc bien les propriétés anti-inflammatoires de la RO dans notre modèle cellulaire.

La Rosiglitazone, molécule de la famille des TZD (Thiazolidinédione) est un agoniste synthétique de PPAR γ . Elle est principalement utilisée pour son action dans la sensibilisation à l'insuline et dans la réduction de la glycémie, la lipidémie et l'insulinémie dans le traitement du diabète de type 2 (Dubois et al., 2002).

Dans la littérature, différents effets anti-inflammatoires ont été attribués à la rosiglitazone. L'activation des PPAR γ avec la rosiglitazone a un effet inhibiteur sur l'activation des macrophages et sur la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 et TNF α), sur l'expression de molécules d'adhérence telles que la P-sélectine et ICAM-1, sur l'expression de la COX2. Elle joue aussi un rôle dans la réduction de l'infiltration des cellules monocytaires lors de l'inflammation (Cuzzocrea et al., 2004). L'équipe de Welch (2003) a mis en évidence que 2 autres gènes (iNOS et COX2) répondent de manière similaire aux quatre gènes cités ci-dessus lors d'un traitement à la RO (10 μ M) suite à une stimulation au LPS (0,1 μ g/ ml). Nous ne voyons pas cet effet pour la COX2, qui est bien induite en présence de LPS, mais sans effet de la RO (figure III 5). Pour expliquer cette différence de réponse au niveau de l'expression de la COX2, il faut signaler que nous ne travaillons pas avec le même type cellulaire que l'équipe de Welch ce qui peut engendrer des différences de réponse à des stimulations similaires. En effet, Welch et ses collaborateurs travaillent sur des macrophages murins issus du péritoine, alors que nous travaillons avec une lignée de monocytes humains différenciés en culture en macrophages.

Dans le cas du CD36, nous avons observé une diminution de l'expression génique lors de la stimulation au LPS. L'effet de la RO sur une expression de CD36 LPS-dépendante, est de rétablir une expression proche du CTL (0,7 X par rapport au CTL). Un contrôle positif a donc été réalisé dans le but de confirmer l'effet de PPAR γ sur l'expression de CD36. Différentes stimulations à deux concentrations de RO nous ont permis d'observer une surexpression de CD36 aux faibles concentrations (1 μ M) qui diminue avec l'augmentation de la concentration en RO (50 μ M).

L'équipe de Welch a en effet récemment rapporté que les fortes concentrations en rosiglitazone ont pour effet d'inhiber l'induction de l'iNOS et de la COX2 dans des macrophages PPAR γ -/- stimulés au LPS (Welch *et al.*, 2003). Ils justifient cette observation par le fait que la RO, un agoniste spécifique du PPAR γ à faible concentration, devient aspécifique à plus forte concentration. Ils ont en outre mis en évidence que dans ce dernier cas, l'activité de RO passerait par la liaison à PPAR δ/β .

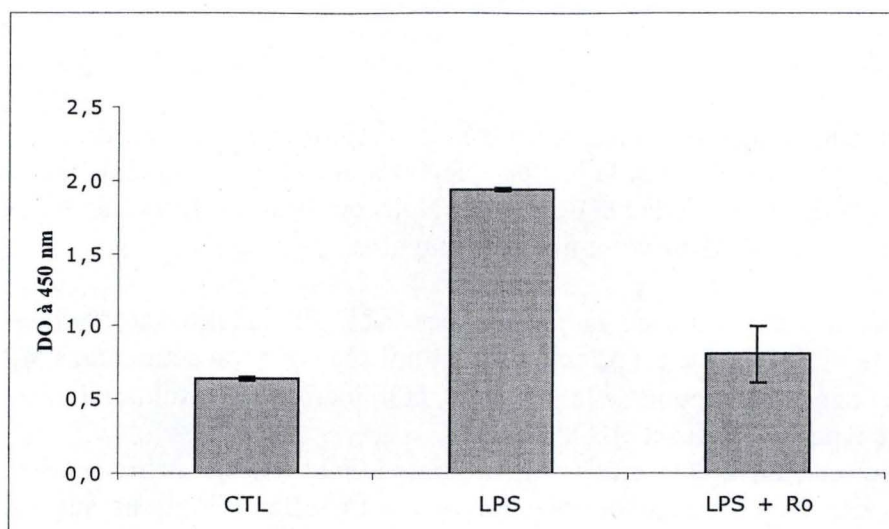


Figure III 12 : Effet de la Rosiglitazone sur l'activation du facteur de transcription AP-1 induite par le LPS. L'activation d'AP-1 est mesurée par un test colorimétrique de liaison à sa séquence consensus. Les valeurs de D.O.à 450 nm sont rapportés pour les différentes conditions de stimulation étudiées. Les écarts-types portent sur 3 valeurs indépendantes.

II. Effet de la rosiglitazone sur l'activation du facteur de transcription AP-1 par le LPS - Etude par test colorimétrique de binding

II A. Résultats

AP-1 est un facteur de transcription qui régule la transcription d'un grand nombre de gènes pouvant intervenir dans l'athérosclérose et les processus inflammatoires, dont MCP-1. Il est constitué de 2 sous-unités appartenant à deux familles : les famille Fos et Jun : L'hétérodimère le mieux décrit est le dimère cFos-cJun. Suite aux résultats obtenus par PCR en temps réel pour le MCP-1, un test colorimétrique a été réalisé dans le but de mettre en évidence une corrélation du profil d'activation de AP-1 avec les résultats de PCR en temps réel. La liaison d'AP-1 à l'ADN est mesurée par un test colorimétrique développé dans le laboratoire (Renard et al., 2001) et décrit au point V et à la figure III 2 du Matériel et Méthode.

En pratique, les monocytes THP-1 différenciés en macrophages sont incubés avec le LPS durant 45 minutes, avec en plus pour les cellules stimulées avec l'agoniste, une pré-incubation de 30 minutes avec la rosiglitazone (2 μ M).

Les résultats obtenus sont présentés à la figure III 12. Le LPS (à 2 μ g/ ml) active bien la liaison du facteur de transcription AP-1 à sa séquence ADN consensus (voir figure I 8 de l'Introduction). Cette activité est augmentée de 3,2 X par rapport au CTL. Lorsque les cellules sont pré-incubées avec la rosiglitazone, nous observons une nette diminution de l'activation de liaison de AP-1 LPS-dépendante, la valeur d'absorbance retombant presque au niveau du CTL.

II B. Discussion

Au vu des résultats obtenus, on peut donc dire que la voie de PPAR γ activée par la rosiglitazone interfère effectivement négativement sur l'activation par le LPS du facteur de transcription AP-1. Il a été récemment montré par plusieurs équipes dont celle de Chinetti (2001), que les ligands de PPAR γ interféraient de manière négative avec le facteur de transcription AP-1. Leurs résultats ont été obtenus par stimulation de cellules endothéliales avec un ligand synthétique de PPAR γ proche de la rosiglitazone, la glitazone. Il serait intéressant de vérifier les effets de la rosiglitazone sur l'activation du facteur NF- κ B après stimulation au LPS ; en effet, plusieurs des gènes induits par le LPS sont également régulés par ce facteur de transcription et PPAR γ activé par un agoniste interagirait également de manière négative avec NF- κ B (Wang et al., 2002).

III. Etude des effets de la rosiglitazone sur l'expression génique induite par le LPS – Etude par damier à ADN en modèle murin

Dans cette troisième partie du travail, nous avons voulu exploiter un damier à basse densité développé en collaboration avec le Dr. Thierry Arnould dans le cadre d'un projet PAI. Etant donné qu'il s'agit d'un modèle murin, nous sommes passés des THP-1 différenciées en macrophages avec le PMA, à une lignée de macrophages murins, les cellules J774.1 (gracieusement fournis par le laboratoire du Prof. H. Bulte, UIA).

III A. Présentation du damier à ADN utilisé : l' Adipo-Athéro-chip

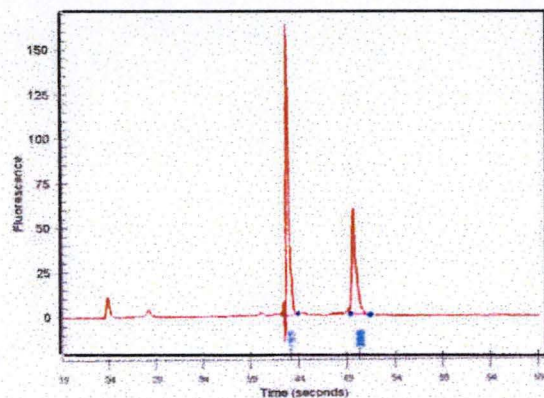
Le damier a été développé dans le cadre de l'étude du métabolisme des lipides et de l'adipogenèse dans un modèle murin. L'Adipo-Athéro-chip comporte 89 sondes de capture dont 6 sondes de capture pour des gènes de référence (House Keeping Gene) (voir Matériel et Méthode à la figure II 7 et Annexe pour la liste complète des gènes). Ces sondes de capture sont ciblées sur de gènes encodant :

- des hormones/ cytokines/ facteurs de croissance
- des récepteurs membranaires
- des protéines impliquées dans la transduction du signal
- des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique et glucidique
- des protéines structurelles
- des protéines de transport
- des protéines impliquées dans le cycle cellulaire
- des facteurs de transcription
- des protéines dites de référence (House Keeping gene)

Initialement, le damier a été conçu pour suivre l'adipogenèse dans un modèle de cellules 3T3-L1 et pour comparer les profils d'expression génique dans du tissu adipeux de divers modèles de souris double-Knock-out (DKO) relevant dans le contexte de l'athérosclérose.

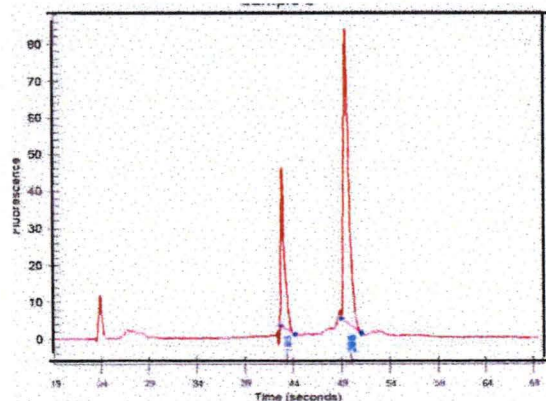
Le damier est aussi un outil intéressant pour l'étude des effets des PPARs sur des macrophages stimulés au LPS . Il cible des gènes intervenant dans la réponse inflammatoire et le métabolisme lipidique ainsi que des gènes encodant les PPARs, ce qui nous intéresse particulièrement.

Dans le cadre de notre étude, plusieurs gènes ciblés par le damier ont attiré notre attention (repris dans le tableau III 5). Welch et son équipe (2003) ont déjà rapporté que certains gènes surexprimés avec le LPS ou l'IFN γ étaient réprimés par la présence de rosiglitazone. Ils mentionnent entre autres le gène CPT1 a (Carnitine Palmitoyl-Transférase). Cet isoforme ne se retrouve pas sur le damier, mais on y trouve les formes CPT1 m (muscle) et CPT 1 l (foie). Nous retrouvons également les gènes encodant IL-6 et l'iNOS. Signalons également des gènes impliqués dans l'athérosclérose (PAI1 par exemple) ainsi que dans l'inflammation



Ratio 28S/ 18S = 0,5

LPS + RO



Ratio 28S/ 18S = 2

Ribopure

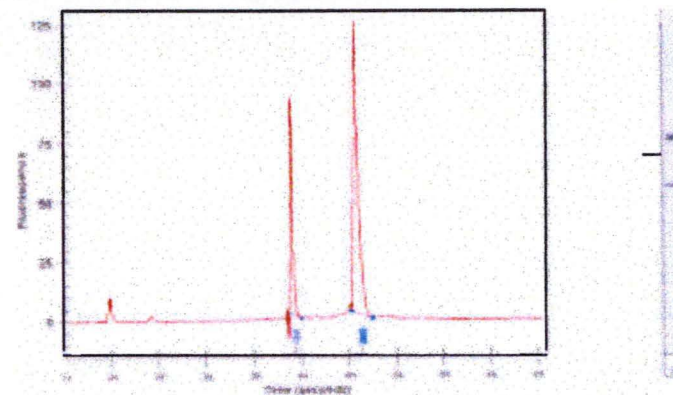
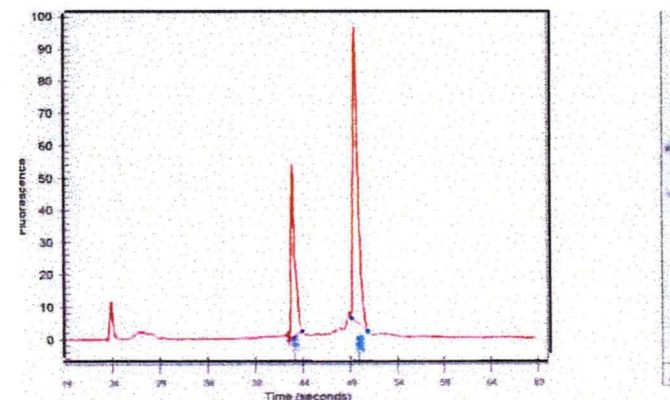


Figure III 13 :
Electrophérogrammes
d'ARN total obtenu avec 2
kits d'extraction d'ARN total
différents: RiboPure et
RNAgents. On observe un
meilleur profil et un ratio plus
proche de 2 pour l'extraction
réalisée avec le kit RNAgents.

Ratio 28S/ 18S = 2,1

CTL



Ratio 28S/ 18S = 1,9

RNAgents

(TNF α par exemple). Le damier porte également des cibles pour les différentes isoformes des PPARs.

Gènes d'intérêts
CPT1 m
CPT1 l
PPAR δ
PPAR γ
RXR α
RXR γ
IL6
iNOS
TNF α
PAI1

Tableau III 5 : Tableau reprenant les gènes *a priori* intéressants au vu de notre étude sur les effets potentiellement anti-inflammatoires des PPARs. Ces gènes jouent soit un rôle dans l'athérosclérose ou dans l'inflammation (PAI1, TNF α , iNOS, IL6, CPT1 m, CPT1 l). D'autres codent pour les PPAR et les RXR (PPAR α PPAR γ , RXR α , RXR γ).

III B. Extraction des ARN totaux

Comme décrit préalablement dans le chapitre Matériel et Méthodes au point IV, les macrophages murins sont d'abord stimulés avec le LPS, en présence ou non des agonistes des PPARs (la RO, le GW et la PGJ2) durant 6 heures. On extrait ensuite l'ARN total.

Lors des extractions d'ARN total réalisées avec le kit d'extraction d'ARN total RiboPure (Ambion) au cours de ce mémoire, un problème au niveau des rendements a été observé. Une trop faible quantité d'ARN total extrait avec ce kit, nous a incité à changer de kit d'extraction. D'autres équipes du laboratoire travaillant avec le kit RNAgents et n'ayant jamais eu de problème de rendement, nous avons opté pour ce dernier. En outre, une comparaison de l'intégrité de l'ARN total a été réalisée suite à différentes extractions avec chacun des deux kits. Les profils obtenus avec le Bioanalyzer (voir Matériel et Méthodes au point VII) pour quatre échantillons extraits sont montrés à la figure III 13. On observe bien une amélioration des profils d'ARN total lorsqu'on passe du kit RiboPure au kit RNAgents. En effet le pic correspondant à l'ARNr 28 S doit avoir une aire deux fois supérieure à celle du pic 18 S. Les ratios 260 nm / 280 nm obtenus avec le kit RNAgents sont par contre plus faibles que ceux obtenus avec le kit d'extraction RiboPure. Néanmoins, ils restent plus constants entre les différentes extractions réalisées.

Le tableau (III 6) ci-après compare à différents niveaux les 2 kits utilisés (RiboPure et RNAgents). On y retrouve les quantités d'ARN total extrait, les valeurs des ratios 260 nm/ 280 nm et les valeurs des ratios 28S/ 18S pour les échantillons extraits. Il faut souligner que la qualité de l'ARN est particulièrement importante pour les expériences d'hybridations sur damiers à ADN.

	Quantité d'ARN tot		Ratio 260/280		Ratio 28S/ 18S	
	RiboPure (V.E. 100 µl)	RNAgents (V.E.20 µl)	RiboPure	RNAgents	RiboPure	RNAgents
CTL	968 ng/ µl (96,8 µg)	4800 ng/ µl (96 µg)	1,8	1,5	2,1	1,9
LPS	616 ng/ µl (61,6 µg)	6465 ng/ µl (129,3 µg)	1,8	1,5	2,3	2
LPS + RO	345 ng/ µl (34,5 µg)	6719 ng/ µl (134,3 µg)	1,8	1,5	0,5	2
LPS + GW	726 ng/ µl (72,6 µg)	6900 ng/ µl (138 µg)	1,8	1,5	1,4	2,0

Tableau III 6 : Tableau reprenant la quantité d'ARN total extrait à partir de 5.10^6 cellules, les valeurs des ratios 260 nm/ 280 nm et les valeurs de ratio 28S/ 18S pour l'analyse de l'intégrité de l'ARN, en fonction des 2 kits d'extraction d'ARN total (RiboPure et RNAgents). Les valeurs des ratios 28S/ 18S et 260/280 obtenus doivent être proches de 2. (V.E.= volume d'éluion)

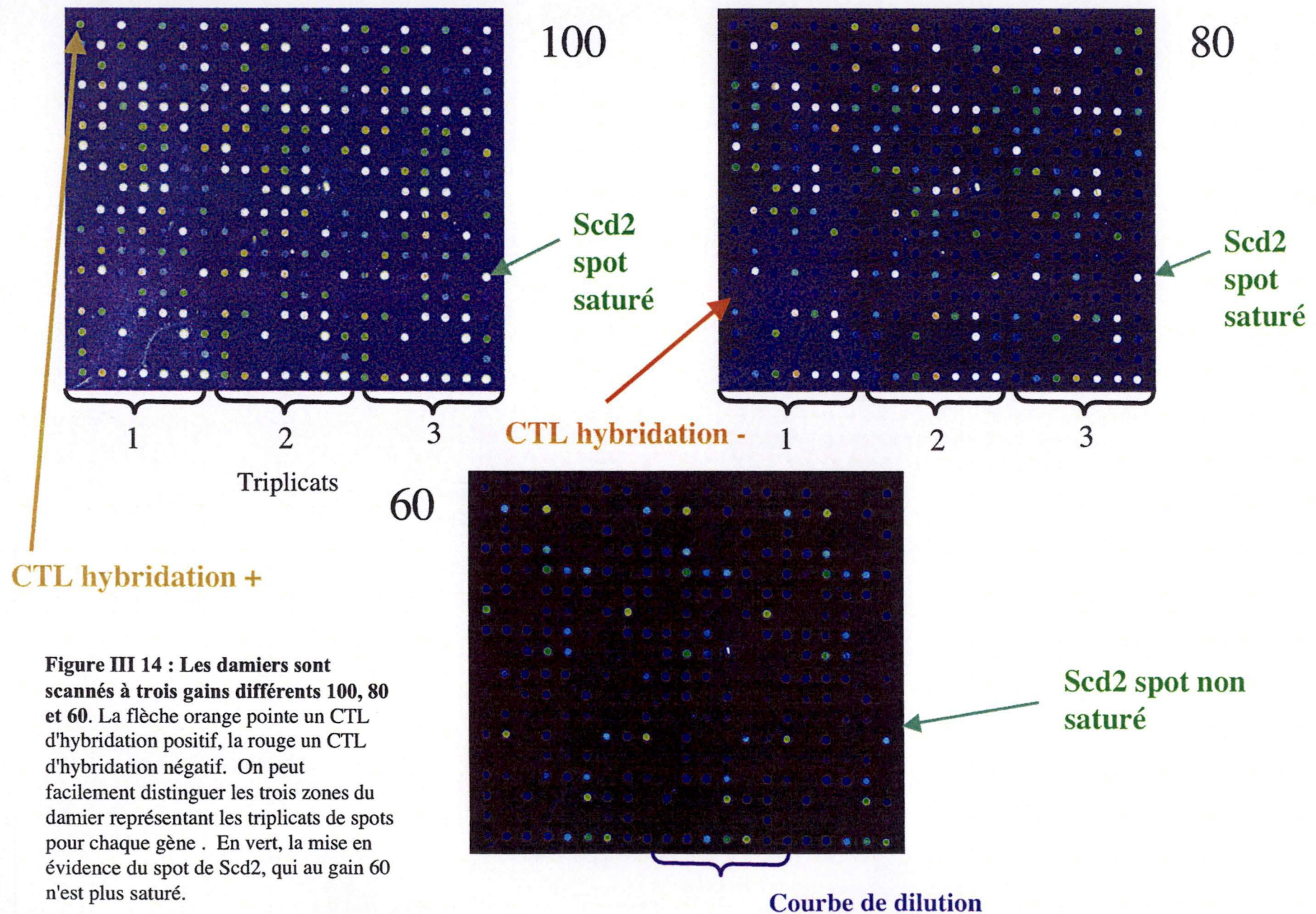
Les quantités d'ARN tot extraites avec le kit d'extraction RNAgents sont environ deux fois supérieures à celles obtenues avec le kit d'extraction RiboPure et surtout restent très semblables d'une extraction à l'autre. Malgré que les ratios 260 nm/ 280 nm soient plus élevés pour les extractions réalisées avec le kit RiboPure, une plus grande confiance sera accordée au kit RNAgents, car l'analyse par Bioanalyzer révèle une meilleure intégrité de l'ARN total : les ratio 28S/ 18S sont plus proches de 2, ce qui est la preuve d'un ARN de bonne qualité. D'autre part, les hybridations réalisées suite à l'utilisation des deux kits d'extraction montrent clairement de plus beaux damiers lors d'une extraction avec le kit RNAgents (résultats non montrés). Ceux-ci possèdent une intensité de fluorescence plus homogène entre eux que les damiers hybridés avec de l'ARN extrait avec le kit RiboPure.

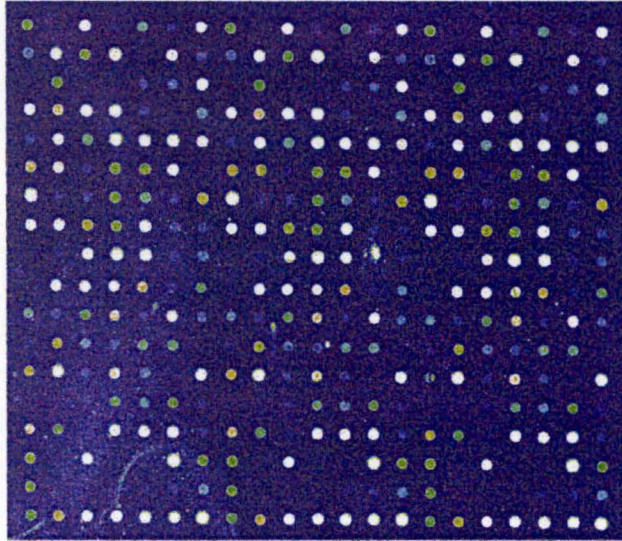
En outre, les ratios 28S/ 18S obtenus pour la condition LPS + RO par l'analyse de l'ARN avec le Bioanalyzer (figure III 13) témoignent d'une dégradation de l'ARN lors des extractions réalisées avec le kit RiboPure. En effet, l'aire sous la courbe 28 S n'est pas deux fois plus importante que l'aire sous la courbe 18S. Etonnamment, on n'observe pas d'élévation de la ligne de base entre les pics 28 S et 18 S, conséquence de la dégradation de l'ARN en fragments d'ARN de plus petite taille. L'absence de ces petits fragments d'ARN peut être expliquée par leur éventuelle éluion lors de l'utilisation de la spin-colonne du kit RiboPure. Afin de contourner ces problèmes, nous avons changé de kit d'extraction d'ARN. Le kit RNAgents est désormais utilisé pour extraire l'ARN en vue de toute hybridation sur damier.

III C. Hybridation et révélation sur damiers à ADN

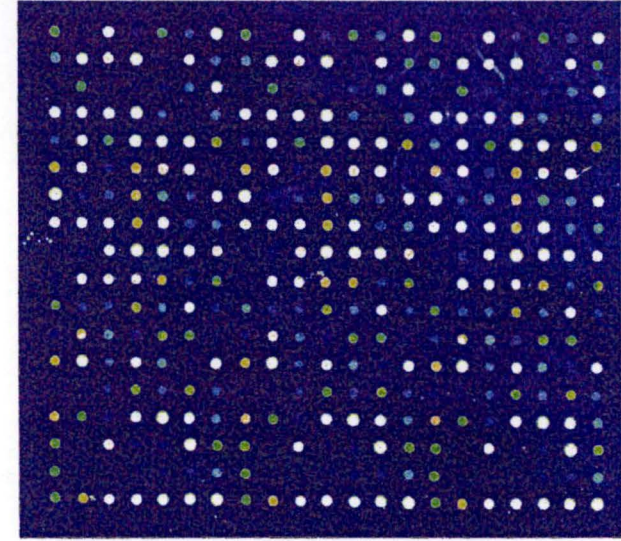
La technique d'hybridation sur le damier est décrite au point X 2 du Matériel et Méthodes. Pour rappel, l'ARN est rétrotranscrit en ADNc marqué, qui est hybridé sur le damier.

La révélation des damiers à ADN se fait par fluorescence grâce à un anticorps couplé à la cyanine3 émettant de la fluorescence à une longueur d'onde de 555 nm, après excitation à une longueur d'onde bien précise de 515 nm. Le mode opératoire de la révélation est décrit dans

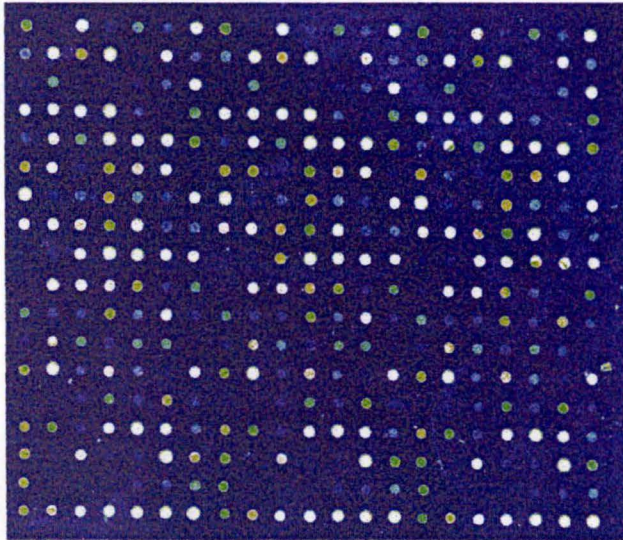




CTL gain 100



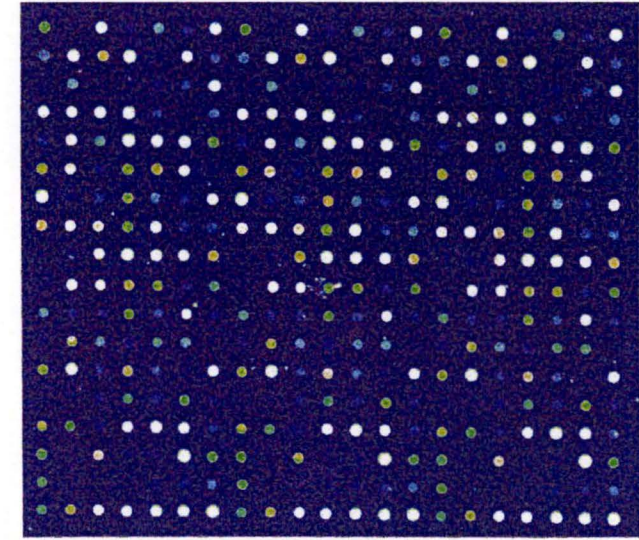
LPS gain 100



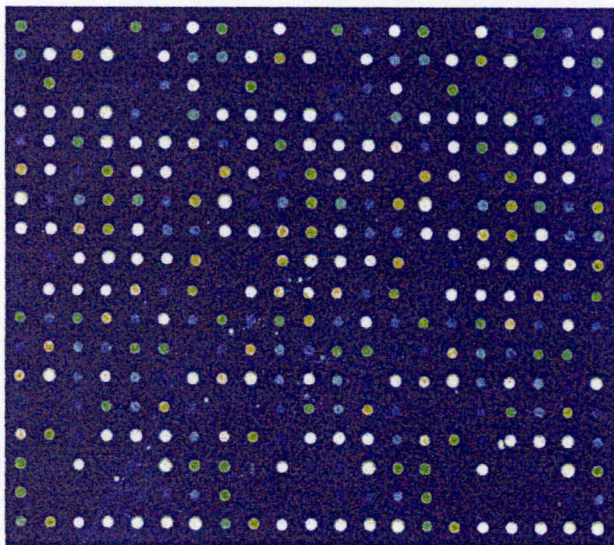
LPS + GW gain 100

Hybridation 1

Figure III 15: Résultats obtenus par hybridation sur l'Adipo-Athéro-chip. Deux hybridations ont été réalisées de manière indépendante: hybridation 1 et 2.

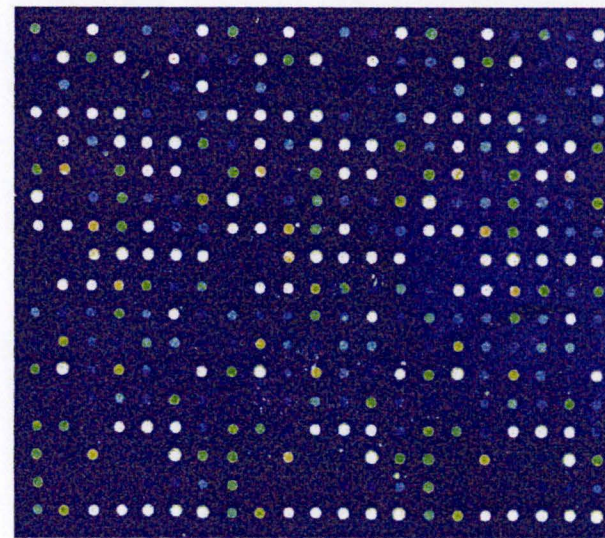


LPS + RO gain 100

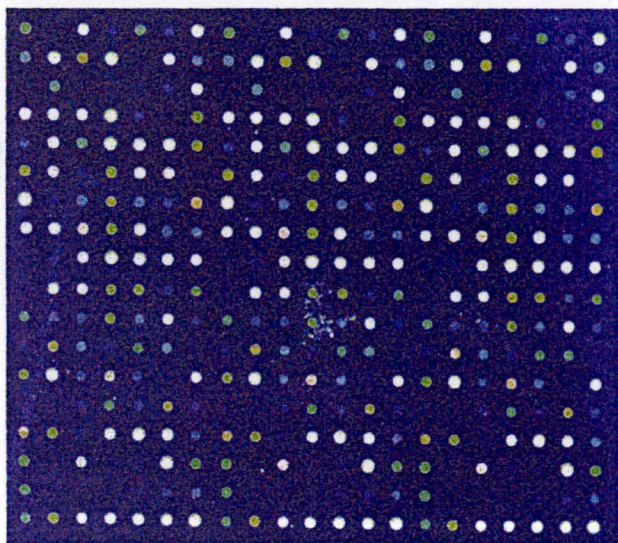


CTL gain 100

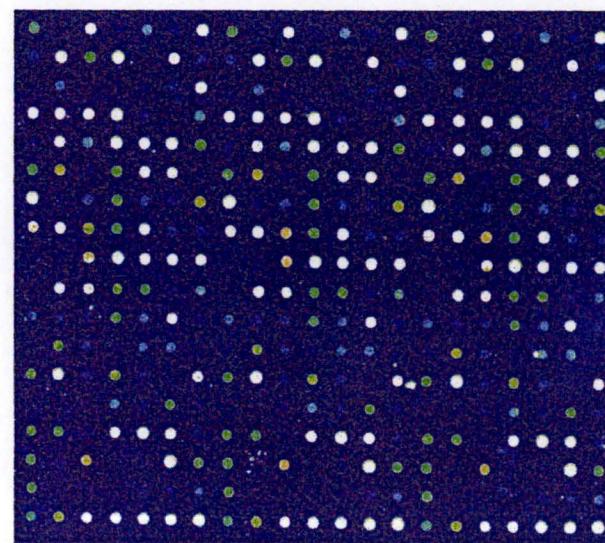
Hybridation 2



LPS gain 100



LPS + GW gain 100



LPS + RO gain 100

le Matériel et Méthodes, au point X 3 et la quantification des damiers est décrite au point X 4 du Matériel et Méthodes. Les damiers sont scannés à 3 gains : 60, 80 et 100 (figure III 14). Ces gains correspondent au pourcentage de fluorescence, émise par le fluorochrome, effectivement repris par le photodétecteur. Les trois gains permettent d'obtenir des images sur lesquelles chaque spot se retrouve au moins une fois insaturé. Seules les valeurs de quantification de spots non saturés seront prises en considération pour l'analyse du damier. Dans l'exemple repris à la figure III 14, le spot du gène Scd2 est saturé aux gains 100 et 80. Nous constatons donc l'importance dans ce cas de réaliser un scan au gain 60. Sur ce damier, il est aussi possible d'observer les trois réplicats des gènes spottés sur le damier ainsi que les différents contrôles d'hybridation positifs et négatifs.

III D. Résultats obtenus avec le damier à ADN

Sur l'ensemble des damiers réalisés, on n'observe aucune tache de fluorescence ni de bulles qui pourraient gêner l'analyse ultérieure des damiers. Les contrôles positifs d'hybridation sont bien tous allumés et les contrôles négatifs d'hybridation éteints. L'intensité de fluorescence globale semble être la même dans tous les damiers (figure III 15), le bruit de fond est faible et les spots bien définis.

L'analyse des damiers est réalisée avec le programme Statistical Software. Le fonctionnement de ce programme passe par plusieurs étapes :

- 1- le programme retire d'abord le bruit de fond (les spots retenus pour l'analyse sont ceux dont l'intensité est 2,5 fois au-dessus du bruit de fond)
- 2- il réalise ensuite une moyenne des 3 spots et établit un coefficient de variabilité (C.V.), qui permet de définir les valeurs des spots à exclure lors de l'analyse (par exemple lorsqu'une des trois zones du damier est inexploitable, il supprime la valeur de cette zone)
- 3- il effectue une normalisation par les standards internes, ce qui efface la variabilité due à la transcription inverse
- 4- il effectue une normalisation par rapport aux gènes de référence, ce qui efface la variabilité due à la quantité d'ARN introduite lors de la RT
- 5- il compile les résultats sous forme de tableaux Excel

Il ne nous reste ensuite plus qu'à réaliser une représentation graphique grâce au programme Excel des résultats obtenus sous forme de tableaux. Les résultats obtenus sont représentés sous forme graphique dans la figure III 16.

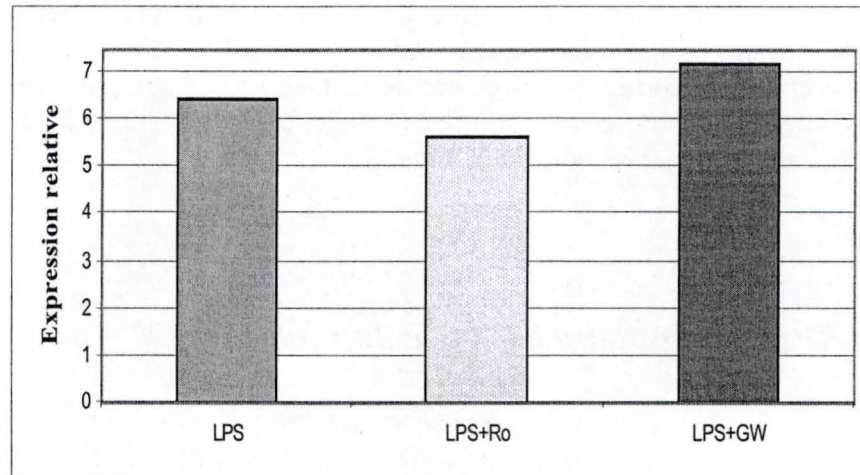


Figure III 17 : Représentation des variations de l'expression génique de iNOS en fonction des conditions de stimulations : LPS, LPS + RO et LPS + GW, en fonction du CTL établi arbitrairement à 1.

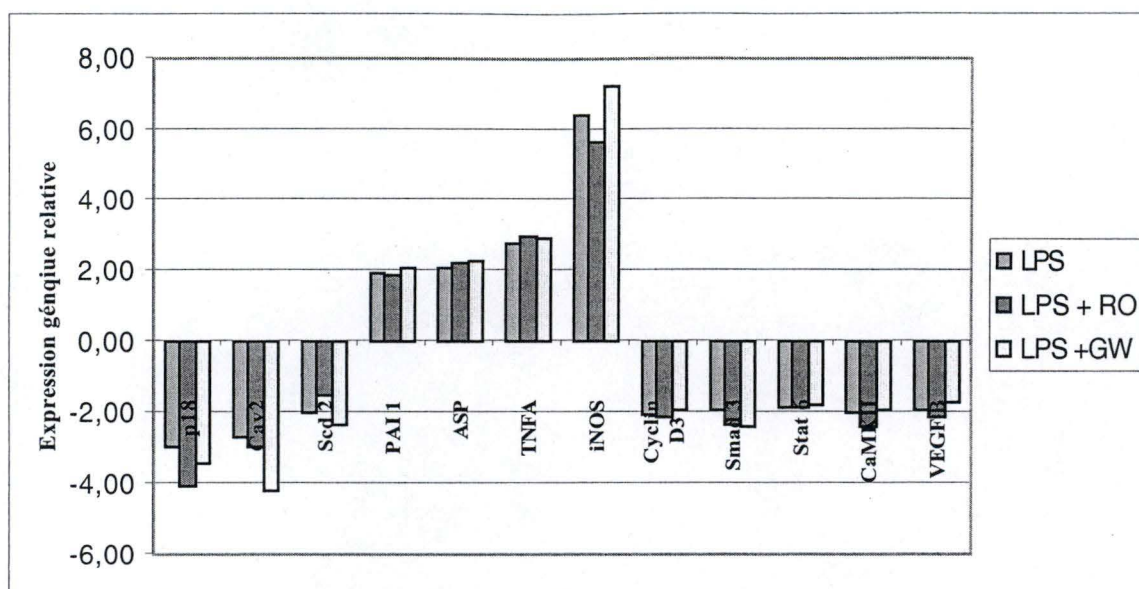


Figure III 16 : Représentation graphique des résultats obtenus par hybridation sur l'Adipo-Athéro-chip dans trois conditions de stimulation : LPS, LPS + RO, LPS + GW.

La figure III 16 ci-dessus comporte un groupe de gènes définis par un tri sélectif réalisé selon les critères suivants :

- seules les valeurs qualitatives et quantitatives pour les ratios ont été prises en considération (les ratios qualitatifs indiquent uniquement s'il y a une sur- ou sous-expression par rapport à la condition CTL pour laquelle l'intensité du spot est souvent trop faible ($< 2,5 \times$ le bruit de fond) ; les ratios quantitatifs sont des valeurs précises de mesure de la sur- ou sous-expression d'un gène).
- les gènes doivent avoir une variation de leur expression au minimum de -2 ou $+2$ dans la condition LPS pour être pris en compte.
- les gènes présentant des variations trop différentes entre les deux damiers ne sont pas pris en compte pour l'analyse des résultats.

Nous pouvons donc observer une légère augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires lors de la présence de LPS (par exemple pour $\text{TNF}\alpha$ on observe une surexpression de $2,8 \times$ par rapport au CTL). Les graphes présentés dans les figures III 16 et 17, sont représentatifs des deux hybridations, une moyenne est réalisée pour les valeurs obtenues avec chaque condition, et cette moyenne est prise en compte pour la réalisation des graphes présentés.

De manière générale, la condition LPS + RO n'induit pas de diminution de l'expression relative des gènes présents sur le damier. La figure III 17 représente l'expression relative du gène iNOS en fonction des conditions de stimulation LPS, LPS+RO et LPS +GW. Le LPS induit bien une surexpression du gène de l'iNOS ($6,42 \times$ par rapport au CTL). Mais les effets attendus des agonistes des PPAR ne sont que très faibles : l'expression de iNOS ne diminue que de peu ($1,15 \times$) suite à une costimulation du LPS avec la RO. Par ailleurs, une surexpression par rapport à la condition de stimulation LPS est observée pour la costimulation du LPS avec le GW ($1,13 \times$). Ces variations restent néanmoins non significatives.

Les deux hybridations réalisées sur l'Adipo-Athéro-chip ont toutes deux été réalisées de manière indépendante (cultures cellulaires différentes, extractions et transcriptions inverses différentes, hybridations réalisées à deux jours différents). Les résultats des deux hybridations se tiennent relativement bien, ce qui nous permet de valider la technique d'hybridation sur notre modèle cellulaire (J774.1). Malheureusement, les profils obtenus ne sont pas fort différents entre les conditions LPS et en présence d'agonistes des PPARs. Il serait donc nécessaire de recommencer au moins une fois l'hybridation sur le damier pour confirmer les résultats.

Malheureusement, les résultats obtenus pour le gène encodant l'IL-6 ne sont pas cohérents entre les deux hybridations. Ce gène n'a donc pas été pris en compte lors de la réalisation du graphe général (figure III 16). Néanmoins, nous constatons que l'effet du LPS reste marquant. Lors de la première hybridation, nous avons obtenu une surexpression qualitative du gène encodant IL-6 (39 X). Dans la seconde hybridation, la surexpression était quantitative (3,2 X). Ceci est dû à la très faible quantité d'ARNm IL-6 dans les échantillons CTL. Malgré des inductions plus marquées par le LPS pour ce gène, nous n'observons pas d'effet de modulation des agonistes des PPARs.

III E. Discussion des résultats obtenus avec le damier à ADN

En tout premier lieu, signalons que des hybridations supplémentaires restent indispensables. Celles-ci nous permettraient de calculer des écart-types sur les valeurs d'expression de chaque gène et donc d'obtenir une confirmation statistiquement plus valable des résultats déjà obtenus pour la surexpression de TNF α et de iNOS dans la condition LPS.

Les résultats obtenus dans ce travail avec le damier sur les macrophages murins stimulés avec le LPS nous ont surpris. Tout d'abord le LPS induit bien l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6. Pour le TNF- α , nous n'observons qu'une induction de 2,8 X par rapport au CTL, ce qui est beaucoup moins que ce que nous avons obtenu par PCR en temps réel avec les macrophages THP-1 (19,77 X). Pour l'IL-6, l'induction semble plus marquée, mais comme l'expression basale est très faible, il s'agit de résultats qualitatifs du moins pour une des deux hybridations. L'expression de iNOS par contre augmente de manière beaucoup plus nette, puisque nous observons une induction de 6,42 X. Globalement, nos résultats sont en concordance avec les observations obtenues par damier à ADN par l'équipe de Gao et Tsan (2004). Ils ont observé que le LPS induit la surexpression de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1 β et IL-6.

L'équipe de Lazarov (2000) a également décrit que le LPS induit chez les monocytes, les macrophages et les neutrophiles la production d'un nombre de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) et de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, P-sélectine et E-sélectine). Gao et Tsan (2004) ont observé par l'utilisation d'un damier à ADN la surexpression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires lors de la stimulation de macrophages au LPS (entre autres IL-1 β et TNF α).

On peut quand même se demander, si dans ce modèle de macrophages murins, les conditions de stimulation au LPS étaient optimales (concentration en LPS, temps de stimulation) ou s'il s'agit d'une lignée peu sensible. Il existe d'autres lignées de macrophages murins, tels que les cellules RAW 246.7 disponibles à l'ATCC et qui sont plus couramment utilisées dans la

littérature. Signalons que c'est dans cette lignée que McIntyre et al. (2003) ont montré que l'acide lysophosphatidique (LPA) était un ligand naturel à haute affinité pour le PPAR γ .

Si l'on considère les résultats obtenus avec les ligands des PPARs, soit la rosiglitazone ou le GW501516, ils sont décevants puisque nous ne voyons pour ainsi dire pas d'effet sur l'expression induite par le LPS, contrairement à ce que nous avons observé pour la rosiglitazone sur les macrophages THP-1. Le GW, un agoniste du PPAR β/δ est actuellement de plus en plus décrit dans la littérature comme une molécule ayant des effets anti-inflammatoires. L'équipe de Welch (2003) a en effet récemment mis en évidence l'inhibition de l'expression génique de COX2 et de iNOS lors d'une stimulation avec le LPS et le GW. Par contre, les observations réalisées par l'équipe de Lee (2003), proposent que les ligands de PPAR β/δ peuvent avoir des effets positifs sur l'inflammation. Une étude menée sur des cellules spumeuse PPAR β/δ -/- a montré une augmentation de la disponibilité en molécules anti-inflammatoires ainsi qu'une diminution de moitié des lésions athérosclérotiques. Ce qui leur permet d'attribuer un rôle plutôt pro-inflammatoire pour les PPAR β/δ . On constate donc que le rôle de PPAR β/δ dans l'inflammation reste controversé.

L'une des raisons de cette absence d'effet est peut-être que les inductions par le LPS n'étaient pas très marquées. Comme déjà signalé, il faudrait sans doute répéter ces expériences sur une autre lignée de macrophages murins et après avoir validé les conditions de stimulation au LPS.

Par ailleurs, un parallélisme récent (Lehrke et Lazar 2004) fait entre les cellules spumeuses et les adipocytes nous pousse à penser qu'il serait intéressant d'étudier les profils d'expression génique obtenus par damier à ADN pour les adipocytes (Mémoire A. Depauw, 2004) et de les comparer aux profils obtenus pour des macrophages stimulés avec des LDL-oxydées. En effet, les macrophages murins J774.1 mis en présence de ox-LDL se différencient en cellules spumeuses, ce qui a été observé après une coloration Oil red-O de ces cellules lors du travail de thèse de Sofia Dos Santos. Une perspective de travail serait de réaliser une étude comparative de l'expression génique entre les adipocytes et les cellules spumeuses formées à partir des macrophages murins J 774.1.

*Conclusions et
Perspectives*

Ce travail de mémoire a été réalisé afin de mettre en évidence les effets potentiellement anti-inflammatoires des PPARs. Nous avons utilisé comme modèle expérimental des macrophages – humains et murins – connus pour être impliqués dans les réactions inflammatoires et dans le développement des lésions athérosclérotiques. Pratiquement, nous avons exploré les réponses de ces cellules stimulées avec du LPS, composant de la paroi des bactéries Gram négatives, en présence ou non d'agonistes des PPARs (rosiglitazone, GW501516 et 15d-PGJ2), et ce par l'analyse des taux d'expression de gènes au niveau des ARNm. Deux approches ont été utilisées pour suivre l'expression génique, la PCR en temps réel (macrophages humains), et un damier à ADN développé au laboratoire (macrophages murins).

Dans un premier temps, nous avons établi un profil d'expression génique pour des macrophages humains (THP-1) stimulés au LPS pour nous assurer que le modèle utilisé était exploitable. Nous avons pu mettre en évidence la surexpression d'un certain nombre de gènes (définis *a priori* sur base de la validation du damier DualChip Human General), dont des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α ou encore l'IL-6, des enzymes intervenant dans les processus inflammatoires comme la COX-2, l'enzyme anti-oxydante MnSOD2, ainsi que d'autres gènes déjà décrits dans la littérature comme étant surexprimés en présence de LPS (IGFBP-3 et MCP-1), et enfin la THBD, régulateur négatif de la thrombine.

Nous avons ensuite décidé d'évaluer les effets de divers agonistes des PPARs sur le profil d'expression génique induit par le LPS. Nous nous attendions à observer un effet protecteur, et donc une diminution des niveaux d'expression génique pour les différents gènes régulés par le LPS. Signalons qu'à cet égard, trois agonistes différents de PPAR ont été sélectionnés :

- La rosiglitazone, un ligand bien connu à haute affinité pour PPAR γ
- La 15d-PGJ(2), autre ligand de PPAR γ , dont les effets anti-inflammatoires sont décrits dans la littérature, mais qui pourrait agir via des voies PPAR γ - indépendantes
- Et le GW501516, ligand spécifique pour l'isoforme PPAR β/δ

Nos résultats confirment que la rosiglitazone et la 15d-PGJ(2) inhibent bien l'expression de plusieurs gènes induite par le LPS. Il s'agit des gènes encodant le MCP-1, l'IGFBP-3, l'IL-6 et le TNF- α pour la rosiglitazone. Ni la COX-2, ni l'IL-1 β , ni la SOD-2 ne présentent de changement par rapport à la condition LPS seul. Pour la 15d-PGJ(2), nous observons une inhibition pour le TNF- α , l'IL-1 β et l'IGFBP-3.

Nous n'observons pas d'effet avec le GW501516, ce qui est en contradiction avec les données de la littérature, comme déjà discuté au point III.E du chapitre Résultats et Discussion. Les différences entre rosiglitazone et 15d-PGJ(2) s'expliquent par la spécificité beaucoup plus grande de la rosiglitazone. Dans notre modèle, la rosiglitazone régule négativement quatre gènes induits par le LPS. Etonnamment, aucun des autres gènes – typiquement sous l'influence du facteur de transcription NF- κ B – n'a répondu à la présence de rosiglitazone. Nous savons que le gène encodant MCP-1 contient dans sa région régulatrice des sites de réponse au facteur de transcription AP-1, ce qui nous a conduit à vérifier et confirmer nos résultats par un dosage colorimétrique de l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription. Effectivement, la même tendance est observée, la rosiglitazone contrecarre l'activation de AP-1 due à la stimulation au LPS. A ce niveau, il nous semble évident que le dosage colorimétrique devra également être réalisé sur le facteur de transcription NF- κ B, ce qui n'a pas pu être fait lors du mémoire par manque de temps. En plus de ces deux facteurs de transcription, il serait également très intéressant de réaliser une série de Western Blots sur les formes phosphorylées des différentes kinases de la voie des MAPK activées par le LPS, et ce dans les conditions de stimulation au LPS en présence ou non des agonistes des PPARs.

Dans un second temps, nous avons décidé d'utiliser la technique des damiers à ADN, exploitant l'Adipo-Athéro-chip développé au laboratoire. En effet, ce damier comporte 89 sondes de capture qui représentent des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, la réponse inflammatoire et la différenciation adipocytaire. D'après la littérature, les PPARs régulent négativement l'expression de plusieurs gènes présents sur le damier. La présence de sondes de capture pour les différents isoformes de PPAR ainsi que pour les RXR, peut également apporter de précieuses informations quant aux régulations inter-voies de transduction du signal. Le modèle cellulaire utilisé a été celui de la lignée de macrophages murins, les J774.1. Deux hybridations indépendantes ont été réalisées, mais les résultats obtenus ne nous permettent pas de tirer de conclusion définitive. En premier lieu, des hybridations supplémentaires sont requises afin de définir statistiquement si les variations des niveaux d'expression génique observées pour certains gènes (iNOS par exemple) sont statistiquement pertinentes. Deuxièmement, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de la rosiglitazone. Mais comme déjà discuté au point III.E du chapitre des Résultats et Discussion, on ne peut exclure que les conditions de stimulation avec le LPS n'étaient pas optimales. Il faudrait probablement aussi refaire l'expérience sur un autre modèle de macrophages murins, mieux caractérisés, les cellules RAW264.7.

Enfin dans la littérature, on retrouve une convergence des fonctions du macrophage avec celles des adipocytes, et ce dans des contextes liés à l'obésité, à l'athérosclérose et au syndrome métabolique (Lehrke et Lazar, 2004). En effet, ces deux types cellulaires sont impliqués dans le stockage lipidique et la sécrétion de cytokines dans des contextes pathologiques. Des macrophages ont également été retrouvés au sein du tissu adipeux de personnes obèses. Cette ressemblance troublante s'explique en partie par le fait que PPAR γ est un régulateur clé de l'adipogenèse, mais également de la maturation des macrophages. Une perspective majeure de ce travail serait donc, au moyen de l'Adipo-Athéro-chip, de réaliser des hybridations comparatives entre adipocytes à différents stades de maturation, avec des macrophages en présence ou non de oxLDL. Ensuite, l'effet des PPARs pourrait être évalué sur l'expression des gènes impliqués tant dans le métabolisme lipidique que dans la réponse inflammatoire de ces deux types cellulaires.

Nous avons dans ce travail mis en évidence un rôle potentiellement anti-inflammatoire de PPAR γ dans la réponse au LPS. La rosiglitazone est en effet capable de contrecarrer la surexpression, au niveau des ARNm, de gènes tels que MCP-1 ou IGFBP-3 impliqués respectivement dans le recrutement des leucocytes et dans les processus de prolifération et de survie cellulaire. D'autres résultats, ayant trait aux résultats sur damier à ADN, corroboreront peut-être cette tendance après une analyse statistique plus poussée. Il faudra maintenant expliquer à l'échelle moléculaire les mécanismes d'action de la rosiglitazone et vérifier s'ils passent par l'inhibition d'AP-1 et/ou de NF- κ B, ou encore d'autres facteurs de transcription.

Bibliographie

- Agnese, D. M., Calvano, J. E., Hahm, S. J., Calvano, S. E. & Lowry, S. F. Insulin-like growth factor binding protein-3 is upregulated in LPS-treated THP-1 cells. *Surg Infect (Larchmt)* **3**, 119-125; discussion 125-116 (2002).
- Amura, C. R., Kamei, T., Ito, N., Soares, M. J. & Morrison, D. C. Differential regulation of lipopolysaccharide (LPS) activation pathways in mouse macrophages by LPS-binding proteins. *J Immunol* **161**, 2552-2560 (1998).
- Auger, M. J. a. R., A.J. The biology of the macrophages. *J.O.D.*, 3-74 (1992).
- Barbier, O., Torra, I. P., Duguay, Y., Blanquart, C., Fruchart, J. C., Glineur, C. & Staels, B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 717-726 (2002).
- Barish, G. D. & Evans, R. M. PPARs and LXRs: atherosclerosis goes nuclear. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 158-165 (2004).
- Barnes, P. J. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 867-870 (1997).
- Barnes, P. J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**, 1066-1071 (1997).
- Beck-Schimmer, B., Madjdpour, C., Kneller, S., Ziegler, U., Pasch, T., Wuthrich, R. P., Ward, P. A. & Schimmer, R. C. Role of alveolar epithelial ICAM-1 in lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Eur Respir J* **19**, 1142-1150 (2002).
- Bishop-Bailey, D. & Wray, J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **71**, 1-22 (2003).
- Blanquart, C., Barbier, O., Fruchart, J. C., Staels, B. & Glineur, C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 267-273 (2003).
- Bosque, F., Belkaid, Y., Briend, E., Hevin, B., Lebastard, M., Soussi, N. & Milon, G. The biology of macrophages. *Pathol Biol (Paris)* **45**, 103-109 (1997).
- Brabender, J., Lord, R. V., Metzger, R., Park, J., Salonga, D., Danenberg, K. D., Holscher, A. H., Danenberg, P. V. & Schneider, P. M. Role of retinoid X receptor mRNA expression in Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* **8**, 413-422 (2004).
- Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M. & Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354-366 (1996).
- Breder, C. D. & Saper, C. B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res* **713**, 64-69 (1996).
- Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-193 (2000).
- Chai, J. & Tarnawski, A. S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol* **53**, 147-157 (2002).
- Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P. & Evans, R. M. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* **7**, 48-52 (2001).
- Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M. & Tontonoz, P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* **7**, 161-171 (2001).
- Chinetti, G., Fruchart, J. C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors with functions in the vascular wall. *Z Kardiol* **90 Suppl 3**, 125-132 (2001).
- Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I. P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.

C., Chapman, J., Najib, J. & Staels, B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **273**, 25573-25580 (1998).

Cock terrie-Anne, A. J. PPARgamma fundamental role in adipogenesis. *International Congress Series* **1262**, 47-50 (2004).

Collin, M., Patel, N. S., Dugo, L. & Thiemermann, C. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-deoxydelta12,14 prostaglandin J2 against the multiple organ failure caused by endotoxin. *Crit Care Med* **32**, 826-831 (2004).

Collins, T. & Cybulsky, M. I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* **107**, 255-264 (2001).

Colotta, F., Borre, A., Wang, J. M., Tattaneli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Peri, G. & Mantovani, A. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* **148**, 760-765 (1992).

Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Maffia, P., Patel, N. S., Di Paola, R., Ialenti, A., Genovese, T., Chatterjee, P. K., Di Rosa, M., Caputi, A. P. & Thiemermann, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* **483**, 79-93 (2004).

De Martin, R., Hoeth, M., Hofer-Warbinek, R. & Schmid, J. A. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, E83-88 (2000).

Delerive, P., Fruchart, J. C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* **169**, 453-459 (2001).

Dubois, M., Vantyghem, M. C., Schoonjans, K. & Pattou, F. [Thiazolidinediones in type 2 diabetes. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)]. *Ann Endocrinol (Paris)* **63**, 511-523 (2002).

Duez, H., Fruchart, J. C. & Staels, B. PPARs in inflammation, atherosclerosis and thrombosis. *J Cardiovasc Risk* **8**, 187-194 (2001).

Dunon, D., Piali, L. & Imhof, B. A. To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 714-723 (1996).

Dunzendorfer, S., Lee, H. K., Soldau, K. & Tobias, P. S. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS-responses. *Faseb J* (2004).

Duval, C., Chinetti, G., Trottein, F., Fruchart, J. C. & Staels, B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* **8**, 422-430 (2002).

Francis, G. A., Annicotte, J. S. & Auwerx, J. PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 186-191 (2003).

Fruchart, J. C. Overview. PPAR and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Risk* **8**, 185-186 (2001).

Gao, B. & Tsan, M. F. Induction of cytokines by heat shock proteins and endotoxin in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 1149-1154 (2004).

Glass, C. K. & Witztum, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503-516 (2001).

Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* **13**, 85-94 (2001).

Hai, T. & Hartman, M. G. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**, 1-11 (2001).

Han, K. H., Chang, M. K., Boullier, A., Green, S. R., Li, A., Glass, C. K. & Quehenberger, O. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest* **106**, 793-802 (2000).

- Jiang, C., Ting, A. T. & Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82-86 (1998).
- Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**, 16483-16486 (1995).
- Kielian, T. L. & Blecha, F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. *Immunopharmacology* **29**, 187-205 (1995).
- Kielian, T. L., Ross, C. R., McVey, D. S., Chapes, S. K. & Blecha, F. Lipopolysaccharide modulation of a CD14-like molecule on porcine alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* **57**, 581-586 (1995).
- Lazarov, S., Balutsov, M. & Ianev, E. [The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock]. *Vutr Boles* **32**, 33-40 (2000).
- Lee, C. H., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W. A., Evans, R. M. & Curtiss, L. K. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science* **302**, 453-457 (2003).
- Lehrke, M. & Lazar, M. A. Inflamed about obesity. *Nat Med* **10**, 126-127 (2004).
- Lemberger, T., Desvergne, B. & Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 335-363 (1996).
- Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241 (2000).
- Marx, N., Libby, P. & Plutzky, J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk* **8**, 203-210 (2001).
- Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P. & Plutzky, J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* **153**, 17-23 (1998).
- McIntyre, T. M., Pontsler, A. V., Silva, A. R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J. C., Zimmerman, G. A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H. & Prestwich, G. D. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 131-136 (2003).
- Michalik, L. & Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 564-570 (1999).
- Miwa, Y., Taba, Y., Miyagi, M. & Sasaguri, T. Physiology and pharmacology of the prostaglandin J2 family. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **123**, 34-40 (2004).
- Naito, M., Nomura, H., Esaki, T. & Iguchi, A. Characteristics of macrophage-derived foam cells isolated from atherosclerotic lesions of rabbits. *Atherosclerosis* **135**, 241-247 (1997).
- Neuberg, M., Adamkiewicz, J., Hunter, J. B. & Muller, R. A Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site. *Nature* **341**, 243-245 (1989).
- Neve, B. P., Fruchart, J. C. & Staels, B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* **60**, 1245-1250 (2000).
- Osterud, B. & Bjorklid, E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* **83**, 1069-1112 (2003).
- Ozanne, B. W., McGarry, L., Spence, H. J., Johnston, I., Winnie, J., Meagher, L. & Stapleton, G. Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur J Cancer* **36**, 1640-1648 (2000).
- Panzer, U., Schneider, A., Guan, Y., Reinking, R., Zahner, G., Harendza, S., Wolf, G., Thaiss, F. & Stahl, R. A. Effects of different PPARgamma-agonists on MCP-1 expression and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* **62**, 455-464 (2002).

- Piret, B. & Piette, J. Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells. *Nucleic Acids Res* **24**, 4242-4248 (1996).
- Prost, D., Moatti, D. and Ollivier, V. Rôle de l'interaction monocytes-cellules endothéliales dans la formation, le développement et les complications de la plaque d'athérome. *Revue française des Laboratoires* **328**, 69-72 (2000).
- Puddu, P., Puddu, G. M. & Muscari, A. Peroxisome proliferator-activated receptors: are they involved in atherosclerosis progression? *Int J Cardiol* **90**, 133-140 (2003).
- Reape, T. J. & Groot, P. H. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147**, 213-225 (1999).
- Renard, P., Ernest, I., Houbion, A., Art, M., Le Calvez, H., Raes, M. & Remacle, J. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res* **29**, E21 (2001).
- Ricote, M., Valledor, A. F. & Glass, C. K. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 230-239 (2004).
- Ronni, T., Agarwal, V., Haykinson, M., Haberland, M. E., Cheng, G. & Smale, S. T. Common interaction surfaces of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain stimulate multiple nuclear targets. *Mol Cell Biol* **23**, 2543-2555 (2003).
- Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* **276**, 37731-37734 (2001).
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993).
- Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**, 791-804 (1995).
- Rothwarf, D. M. & Karin, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* **1999**, RE1 (1999).
- Schachtrup, C., Emmler, T., Bleck, B., Sandqvist, A. & Spener, F. Functional analysis of peroxisome proliferator response element motifs in genes of fatty acid binding proteins. *Biochem J Pt* (2004).
- Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928 (1986).
- Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 405-455 (1994).
- Silverman, N. & Maniatis, T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* **15**, 2321-2342 (2001).
- Takano, H. & Komuro, I. Roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in cardiovascular disease. *J Diabetes Complications* **16**, 108-114 (2002).
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. & Evans, R. M. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* **93**, 241-252 (1998).
- Torra, I. P., Chinetti, G., Duval, C., Fruchart, J. C. & Staels, B. Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* **12**, 245-254 (2001).
- Vlaeminck-Guillem, V., Laudet, V. & Duterque-Coquillaud, M. [Negative cross-talk between nuclear receptors and transcription factors: implications in inflammation and oncogenesis]. *Med Sci (Paris)* **19**, 1121-1127 (2003).
- Vosper, H., Khoudoli, G. A., Graham, T. L. & Palmer, C. N. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* **95**, 47-62 (2002).
- Wang, N., Verna, L., Chen, N. G., Chen, J., Li, H., Forman, B. M. & Stemerman, M. B. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-

inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 34176-34181 (2002).

Wang, P., Anderson, P. O., Chen, S., Paulsson, K. M., Sjogren, H. O. & Li, S. Inhibition of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB in CD4 T cells by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Int Immunopharmacol* **1**, 803-812 (2001).

Weber, S. M., Scarim, A. L. & Corbett, J. A. PPARgamma is not required for the inhibitory actions of PGJ2 on cytokine signaling in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E329-336 (2004).

Welch, J. S., Ricote, M., Akiyama, T. E., Gonzalez, F. J. & Glass, C. K. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6712-6717 (2003).

Whelan, J. Selectin synthesis and inflammation. *Trends Biochem Sci* **21**, 65-69 (1996).

Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* **40**, 861-868 (2004).

Zhang, G. & Ghosh, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* **107**, 13-19 (2001).

Ziouzenkova Ouliana, P. J. Exogenous and endogenous mechanisms of PPAR activation: implications for inflammation and atherosclerosis. *International Congress Series* **1262**, 147-151 (2004).

16 JUIN 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

Annexe

Category	Gene	Name	Function	Category	Gene	Name	Function
Hormones/Cytokines/Growth Factors	ACrp30	Adipose Complement-related protein 30		Lipid and glucid metabolism	ACC	Acetyl-CoA carboxylase	Lipogenesis
	AT	Angiotensinogen			ACC2	Acetyl-CoA carboxylase 2	Lipogenesis
	Leptin	Leptin			CL	ATP Citrate Lyase	Lipogenesis
	PDF	Pigment Epithelium-Derived Factor			DHAPAT	Dihydroxyacetone-phosphate-acyl transferase	Lipogenesis
	Renin	Renin			GPAT mito	Glycerol-phosphate-acyl transferase	Lipogenesis
	Resistin	Resistin			Gyk	Glycerol Kinase	Lipogenesis
	SDF-1	Stromal cell-derived factor-1			HSL	Hormone-sensitive lipase	Lipid Mobilisation
	SDF-2	Stromal cell-derived factor-2			L-CPT-1	Liver-carnitin palmitoyl-transferase-1	Mitochondrial transport of fatty-acids
	SPARC	Secreted protein acidic and rich in cystein			M-CPT-1	Muscle-carnitin palmitoyl-transferase-1	Mitochondrial transport of fatty-acids
	TGF beta	Transforming-growth factor beta			CPT-2	Carnitin palmitoyl-transferase-2	Mitochondrial transport of fatty-acids
	Wnt10b	Wnt10 b			Fabp 2	Fatty acid-binding protein 2	Binding fatty-acids metabolism
	VEGF A	Vascular-endothelial growth factor			Fabp 4	Fatty acid-binding protein 4	Binding fatty-acids metabolism
	VEGF B	Vascular-endothelial growth factor			FAS	Fatty acid synthase	Lipogenesis
	VEGF C	Vascular-endothelial growth factor			11-beta HSD	11-beta hydroxysterol dehydrogenase	Steroid metabolism
	IL-6	Interleukin-6			Pref-1	Pre-adipocyte factor-1	Lipogenesis regulation
	TNF alpha	Tumor necrosis factor alpha			LPL1	Lipoprotein lipase 1	Lipid mobilisation
Membrane receptors	Adipsin	Adipsin	Secreted protease		Scd-1	Stearoyl-CoA desaturase-1	Desaturase
	ASP	Acylation-stimulating protein			Scd-2	Stearoyl-CoA desaturase-2	Desaturase
	PAI-1	Plasminogen activator-inhibitor-1	Fibrinolysis inhibitor		UCP-2	Uncoupling protein-2	Uncoupling protein
	b3-AR	b3-Adrenergic Receptor			Perilipin A	Perilipin A	Lipid Mobilisation
	ATR I	Angiotensin receptor I			GPD cyto	Glycerol-phosphate deshydrogenase	Lipogenesis
Signal Transduction	ATR II	Angiotensin receptor II		Structural proteins/remodeling tissue	GPD mito	Glycerol-phosphate deshydrogenase	Lipogenesis
	EPa	Endothelin receptor a			GAPDH	Glyceraldehyde-phosphate deshydrogenase	Glycolysis
	CaMK II	Calmodulin-dependent kinase II	Signal transduction		DHAPAT	Dihydroxyacetone-phosphate-acyl transferase	Triglyceride synthesis
	CaMK IV	Calmodulin-dependent kinase IV	Signal transduction		L-PK	L-pyruvate kinase	Glycolysis
	eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	NO production		PEPCK-1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase-1	Glyceroneogenesis
Transcription Factors and transcription Machinery	INOS	Inducible nitric oxide synthase	NO production		ADD1	Adducin 1	Cytoskeleton
	p110 alpha	p110 alpha	P13-k catalytic subunit		Cystatin C	Cystatin C	Protease inhibitor
	C/EBP alpha	CCAAT/Enhancer-binding protein a	Transcription Factor		Gelsolin	Gelsolin	Actin binding
	C/EBP beta	CCAAT/Enhancer-binding protein b	Transcription Factor		Coll VI alpha 2	Collagen VI alpha 2	Extracellular matrix
	C/EBP delta	CCAAT/Enhancer-binding protein d	Transcription Factor		MMP-2	Matrix metalloprotease-2	Secreted protease
Transcription Factors and transcription Machinery	CHOP10	C/EBP homologous protein 10	Transcription Factor		caveolin-1		membrane trafficking/signal transduction
	CREB	cAMP-responsive element-binding protein	Transcription Factor		caveolin-2		membrane trafficking/signal transduction
	GATA 2	GATA 2	Transcription Factor	Stress proteins	HSP 60	Heat shock protein 60	Chaperone
	GATA 3	GATA 3	Transcription Factor		HSP 84	Heat shock protein 90	Chaperone
	GATA 2	GATA 2	Transcription Factor		HSP 86	Heat shock protein 90	Chaperone
	NFATC2	Nuclear factor of activated T cells	Transcription Factor	Membrane transporters	mtCLIC/Clc4	Chloride intracellular channel 4	Intracellular Chloride transporter
	NFATC4	Nuclear factor of activated T cells	Transcription Factor		AAAT	Amino acid transporter	Amino acid transporter
	PPAR delta	Peroxisome proliferator-activated receptor d	Transcription Factor		GLUT-4	Glucose transporter-4	Glucose transporter
	PPAR gamma	Peroxisome proliferator-activated receptor g	Transcription Factor	Cell cycle	Cyclin D3	Cyclin D3	Cell cycle
	RXR alpha	Retinoid-X-receptor a	Transcription Factor		Histone H1	Histone H1	DNA structure
	RXR gamma	Retinoid-X-receptor g	Transcription Factor		p18	p18	Cell cycle
	Smad 3	Smad3	Transcription Factor	Miscellaneous	Haptoglobin	Haptoglobin	Hemoglobin binding protein
	SREBP-1	Sterol-responsive element-binding protein-1	Transcription Factor		HCNP	Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide	Cholinergic neuron development
	Stat 6	Signal transducer and activator of transcriptio	Transcription Factor		rRNA18s	ribosomal RNA 18 s	House keeping
	TBP	TATA-box binding protein (TFIID)	Transcription machinery				